

METHODOLOGISCHE UNTERSUCHUNG ZUR
ENZYMATISCHEN KREATINBESTIMMUNG UND IHRE
BEDEUTUNG FÜR MEDIZIN UND HUMANBIOLOGIE

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades

"D o k t o r d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t"

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

Wulf Quester
geb. in Flensburg

Mainz 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546305_0053

METHODOLOGISCHE UNTERSUCHUNG ZUR
ENZYMATISCHEN KREATINBESTIMMUNG UND IHRE
BEDEUTUNG FÜR MEDIZIN UND HUMANBIOLOGIE

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades

"D o k t o r d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz



Wulf Quester
geb. in Flensburg

Mainz 1980



Berichterstatter: Professor Dr. Dr. Dr. W. Bernhard

Professor Dr. W. Prellwitz

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 1980

Für meine Familie

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Bernhard (Institut für Anthropologie) und Herrn Prof. Dr. W. Prellwitz (Abt. Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin) für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung von Arbeitsmitteln und die freundliche Betreuung der Arbeit. Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Zentrallabors und des Anthropologischen Instituts sowie allen Probanden und Patienten, ohne deren Mitarbeit die Durchführung der Experimente unmöglich gewesen wäre.

INHALTSÜBERSICHT

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Die physiologische Bedeutung des Kreatins</u>	4
3.	<u>Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin</u>	9
3.1.	<u>Nichtenzymatische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin im Serum</u>	9
3.1.1.	Photometrische Bestimmung von Kreatin als Kreatinin nach vorangegangener Zyklisierung im sauren Milieu in der Wärme	9
3.1.2.	Photometrische Bestimmung von Kreatin mit Hilfe der Diacetyl-Reaktion	11
3.2.	<u>Enzymatische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin im Serum</u>	12
3.2.1.	Methode nach TANZER und GILVARG (1959)	14
3.2.2.	Methode nach KIBRICK und MILHORAT (1966)	16
3.2.3.	Methode nach BERLET (1968)	24
3.2.4.	Methode nach BERNT, BERGMAYER und MÖLLERING (1974)	34
3.2.5.	Eine neue einfache Methode zur enzymatischen Kreatinbestimmung (Halbmikromethode)	39
3.2.5.1.	Kreatin-Standard-Lösungen	40
3.2.5.2.	Seren zur Präzisions- und Richtigkeitskontrolle	42
3.2.5.3.	Enteiweißung von Serum	43
3.2.5.4.	Optimale Reaktionsbedingungen	47
3.2.5.5.	Reaktionskinetik	59

3.2.5. 6. Notwendige Geräte	68
3.2.5. 7. Notwendige Reagenzien	69
3.2.5. 8. Herstellung der Lösungen	70
3.2.5. 9. Durchführung der Tests	75
3.2.5.10. Berechnung der Kreatinkonzentration im Serum	80
3.2.5.11. Präzision in der Serie	82
3.2.5.12. Präzision von Tag zu Tag und Richtigkeit	83
3.2.5.13. Linearität der Eichfunktion	84
3.2.5.14. Einfluß verschiedener Stoffe auf das Testsystem	89
3.2.5.15. Hämolytisches Serum	93
3.3. <u>Nichtenzymatische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin im Urin</u>	95
3.3.1. Photometrische Bestimmung von Kreatin als Kreatinin nach vorangegangener Zyklisierung im sauren Milieu in der Wärme	95
3.3.2. Photometrische Bestimmung von Kreatin mit Hilfe der Diacetyl-Reaktion	97
3.4. <u>Enzymatische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin im Urin</u>	98
3.4.1. Bisher gebräuchliche Methoden zur enzymatischen Bestimmung von Kreatin im Urin	98
3.4.2. Eine neue einfache Methode zur enzymatischen Kreatinbestimmung (Halbmikromethode)	100
3.4.2. 1. Durchführung des Tests	100
3.4.2. 2. Berechnung der Kreatinkonzentration im Urin	101
3.4.2. 3. Präzision und Richtigkeit	103
3.4.2. 4. Linearität der Eichfunktion	106
3.4.2. 5. Haltbarkeit der Harnproben	108

3.5.	<u>Ergebnisse der methodologischen Untersuchung zur enzymatischen Kreatinbestimmung</u>	111
4.	<u>Probandenuntersuchung</u>	116
4.1.	<u>Erfasste Merkmale</u>	116
4.1.1.	Anthropometrische Untersuchung	122
4.1.2.	Laborchemische Untersuchung	123
4.1.2.1.	Harnpflichtige Substanzen und anorganisches Phosphat	123
4.1.2.2.	Enzyme	130
4.2.	<u>Querschnittsuntersuchung: Gesamtstichprobe</u>	141
4.3.	<u>Kreatin im Urin</u>	157
4.3.1.	Kreatinausscheidung im 24-Stunden-Urin	157
4.3.2.	Kreatinausscheidung am Tag und in der Nacht	160
4.3.3.	Fraktionierte Sammlung von 24-Stunden-Urinen zur Erkennung von Tagesschwankungen der Kreatinausscheidung	162
4.3.4.	Kreatinausscheidung im morgendlichen Spontanurin an mehreren Tagen	170
4.3.5.	Kreatinausscheidung im 24-Stunden-Urin an mehreren Tagen	174
4.4.	<u>Normwerte für Kreatin im Serum und Urin</u>	175
5.	<u>Diskussion</u>	178
6.	<u>Zusammenfassung</u>	182
7.	<u>Verzeichnis der Abkürzungen</u>	185
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	186

1. Einleitung

Kreatin ist ein biochemisch wichtiges Aminosäurederivat; seine Bildung erfolgt in Leber, Pankreas und Niere. Aus dem Plasma wird Kreatin aktiv in die Muskelzelle aufgenommen und durch das Enzym Creatin-Kinase in einem reversiblen Prozeß zu Kreatinphosphat phosphoryliert. In dieser Form dient es zur raschen Resynthese von ATP und stellt somit eine Energiequelle für die Muskelkontraktion dar. Die Kreatinkonzentration im Plasma ist von seiner Bildungsrate, der exogenen Zufuhr, der Aufnahme in den Muskel, der Speicherung im Muskel sowie der Rückresorption in der Niere abhängig. Bei einer Reduktion der Muskelmasse kann es zu einem Anstieg der Konzentration von Kreatin im Plasma kommen. Störungen der Rückresorption oder Überschreitung der Rückresorptionskapazität der Nierentubuli, bedingt durch ein Überangebot von Kreatin, führen zu einer verstärkten Ausscheidung von Kreatin im Harn (RICHTERICH und COLOMBO 1978).

Kreatin wurde 1835 von CHEVREUL in der Fleischbrühe entdeckt; 1847 erfolgte seine Isolierung aus Muskulatur durch LIEBIG. Aber erst 1904 gelang FOLIN der Nachweis von Kreatin in normalem Menschenharn. Seither wurden vielfältige Anstrengungen zur quantitativen Kreatinbestimmung unternommen. Die vorgeschlagenen Methoden erwiesen sich jedoch als unspezifisch und teilweise schwer durchführbar. Seit 1959 sind spezifische enzymatische Testverfahren bekannt (TANZER und GILVARG), sie haben sich aber bisher nicht durchsetzen können. Trotz des Mangels an praktikablen Methoden erschien eine große Zahl von Publikationen zum Kreatinstoffwechsel bei Mensch und Tier. Heute liegen Ergebnisse von humanbiologischen Studien vor, die sich mit der Kreatinkonzentration im Serum bzw. der Kreatinausscheidung im Urin bei Kindern, Erwachsenen, alternden Menschen, Bewohnern von Höhengebieten sowie bei Individuen nach körperlicher Belastung oder Immobilisation beschäftigen. Auch der genetische Einfluß auf die Kreatinausscheidung wurde an Hand von Zwillingen-

und Familienuntersuchungen geprüft. Von medizinischem Interesse sind insbesondere Arbeiten über das Verhalten des Kreatins im Serum und im Urin bei Muskelerkrankungen, Neoplasmen, exogenen Intoxikationen sowie neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen. Der Wert dieser Untersuchungen wird allerdings oftmals durch die Unzulänglichkeiten der verwendeten unspezifischen Verfahren zur Kreatininbestimmung herabgesetzt bzw. in Frage gestellt.

Auf Grund der engen Verknüpfung von Kreatin mit Muskelaufbau und Muskelabbau sowie Wachstumsvorgängen ist die exakte quantitative Bestimmung von Kreatin im Serum und im Urin für Konstitutionsforschung und Klinik gleichermaßen von Interesse. Es erscheint daher sinnvoll, die heute gebräuchlichen Verfahren zusammenzustellen und insbesondere die spezifischen enzymatischen Methoden kritisch zu betrachten. Gleichzeitig wird eine neue enzymatische Halbmikromethode vorgestellt, die sich in hohem Maße für Routineuntersuchungen zu eignen scheint. Drei bisher bekannte enzymatische Testverfahren werden ebenfalls beschrieben und in einem Methodenvergleich der eigenen Halbmikromethode gegenübergestellt.

Die problemlose Anwendbarkeit der neuentwickelten Methode wird durch eine Probandenuntersuchung unter Beweis gestellt. Da bisher stets nur kleine Stichproben mit enzymatischen Verfahren untersucht wurden, werden an einer größeren Gruppe gesunder, im Arbeitsleben stehender Probanden ($n = 310$) die Normwerte für Kreatin im Serum ermittelt. Zusätzlich durchgeführte Untersuchungen erfassen 36 anthropometrische Variablen und 18 Laborbefunde bei einer Teilstichprobe von 101 Individuen. Ergänzende Kreatininbestimmungen an 24-Stunden-Urinen und Spontanurinen, die über einen längeren Zeitraum gesammelt wurden, sollen einen Beitrag zum vieldiskutierten Problem der menschlichen Kreatininurie liefern.

Der Schwerpunkt der hier durchgeführten Untersuchungen liegt aber bewußt auf der Entwicklung einer neuen, praktikablen Methode zur enzymatischen Kreatininbestimmung. Der

Beschreibung des Verfahrens, seiner analytischen Besonderheiten, Möglichkeiten und Grenzen wird deshalb ein breiter Raum gewährt.

Es ist zu vermuten, daß viele das Kreatin betreffende Probleme auf den Gebieten der Klinischen Chemie und Konstitutionsforschung nur durch die Anwendung spezifischer Analysenverfahren zu lösen sind. Vielleicht kann die vorliegende Arbeit hierzu einen Beitrag leisten, im Sinne einer "chemical anthropometry" (COSA et al. 1950; nach BROŽEK 1965).

2. Die physiologische Bedeutung des Kreatins

Kreatin¹ wird vor allem in Leber, Pankreas und Niere über mehrere Zwischenstufen aus Glycin, Arginin und Methionin synthetisiert (Abb. 2.01). Methionin reagiert dabei als S-Adenosylderivat, das aus ATP und Methionin entsteht. Die Methylierung (2) findet fast ausschließlich in der Leber statt (RAPOPORT 1977). Das gebildete Kreatin gelangt ins Plasma und kann von dort aktiv in die Muskelzelle aufgenommen werden. In der Niere wird Kreatin beim Erwachsenen filtriert und fast quantitativ rückresorbiert. Dabei spielen zum Teil dieselben Transportmechanismen eine Rolle wie bei der Rückresorption der Aminosäuren (RICHTERICH und COLOMBO 1978). Die Regulation der Kreatinsynthese scheint auch beim Menschen - wie bei Huhn und Ratte - dadurch zu erfolgen, daß Kreatin die Synthese der Glycin-Amidino transferase reprimiert (WALKER 1959 und 1960; BERNHARDT 1977).

Intramuskulär reagiert Kreatin mit dem bei Glykolyse und Phosphorylierung gebildeten ATP zu Kreatinphosphat und ADP. Das phosphatübertragende Enzym ist die Creatin-Kinase. Die Reaktion ist reversibel, das Gleichgewicht liegt zugunsten der ATP-Bildung. Die eigentliche Aktionssubstanz und der unmittelbare Energielieferant für die Muskelkontraktion ist das ATP. Durch Umkehrung der Creatin-Kinase-Reaktion wird das verbrauchte ATP rasch wieder bereitgestellt. In der Relaxationsphase erfolgt die Resynthese von Kreatinphosphat ("Reserve-Energiespeicher").

Die willkürlichen Muskeln der Vertebraten enthalten je nach Spezies und Muskelart 200 - 800 mg Kreatin/100 g (GUGGENHEIM 1951). Für den Menschen werden die folgenden Kreatingehalte angegeben: Skelettmuskel 400 - 500 mg/100 g, Herzmuskel ca. 250 mg/100 g, Gehirn 129 mg/100 g, Uterus ca. 30 - 40 mg/100 g (KOUFEN und CONSRUCH 1972).

¹ Kreatin (β-Methylguanidoessigsäure; Methylglycocyamin; N-Amidinosarkosin)

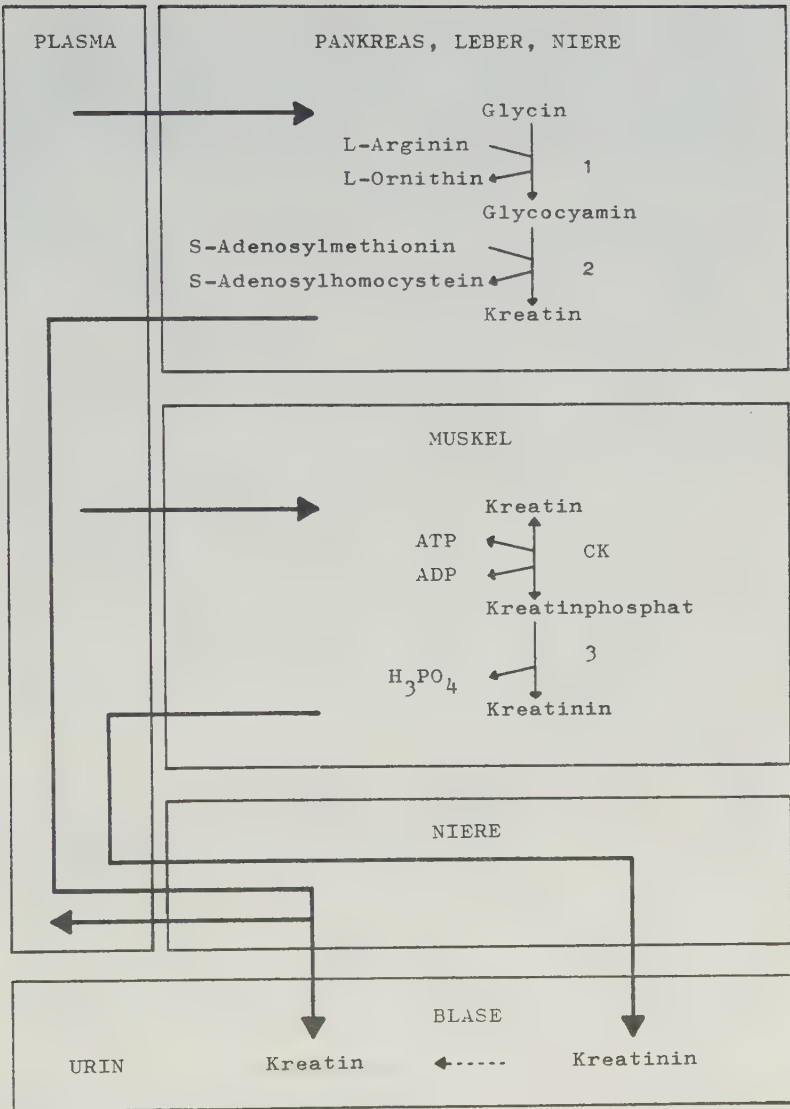


Abb. 2.01

Kreatin- und Kreatinin-Stoffwechsel (in Anlehnung an RICHTERICH und COLOMBO 1978)

1 Glycin-Amidino-transferase; 2 Guanidinoacetat-Methyltransferase; 3 nichtenzymatisch

Kreatinin entsteht aus Kreatinphosphat durch spontane und irreversible Umwandlung (3). Ein diese Reaktion katalysierendes Enzym konnte bisher bei Säugern nicht nachgewiesen werden. Eine direkte Dehydratisierung von Kreatin zu Kreatinin scheint unter physiologischen Bedingungen kaum zu erfolgen (BORSOOK und DUBNOFF 1947). Hingegen lassen Untersuchungen die Vermutung zu, daß bereits in der Blase eine geringgradige Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin stattfindet (TANZER und GILVARG 1959).

Das täglich im Muskelgewebe entstehende Kreatinin stellt etwa 2 % (w/w) des im Körper vorhandenen Kreatins dar (GUGGENHEIM 1951). Es gelangt ins Blut und wird als harnpflichtiger Stoff durch die Niere ausgeschieden. Beim Gesunden wird das Kreatinin ausschließlich glomerulär filtriert und tubulär weder sezerniert noch rückresorbiert. Bei abnehmender Filtrationsleistung der Niere wird es jedoch zunehmend auch über die Tubulusepithelien sezerniert. Zu einem Anstieg des Serum-Kreatinins kommt es bei einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsleistung auf 60 % der Norm, dies entspricht nach der "Intact Nephron Hypothese" einem Ausfall von 40 % der Nephrone (BUDECKE 1978). Unter diesen Bedingungen kann offenbar auch ein Teil des Kreatinins in den Darm ausgeschieden und dort bakteriell metabolisiert werden (RICHTERICH und COLOMBO 1978). Die renale Kreatininausscheidung bedeutet einen Verlust an biologisch labilen Methylgruppen, die bei der Kreatinsynthese irreversibel fixiert wurden. Die ausgeschiedene Menge entspricht etwa den täglich mit dem Methionin der Nahrung zugeführten labilen Methylgruppen (RAPOPORT 1977).

Bei fleischreicher Kost erfolgt aber auch eine direkte Aufnahme von Kreatin. Insbesondere der Verzehr größerer Mengen rohen Fleisches (Tartar, Steaks etc.) kann einen Anstieg des Serum-Kreatins und eine vermehrte Ausscheidung von Kreatin im Harn bewirken. Beim Kochen und Braten von Fleisch hingegen wird Kreatin im allgemeinen zu Kreatinin umgewandelt (WEISS 1976). Landesübliche Normalkost enthält etwa 200 - 400 mg Kreatin pro Tag (BERNHARDT 1977).

Die Ausscheidung von Kreatin im Harn soll bei einem Überschreiten des Serumspiegels von 0,5 mg/100 ml erfolgen (MILHORAT 1953). Eine erhöhte Kreatinausscheidung ist deshalb zu erwarten, wenn das bereitgestellte Kreatin, aus endogener Synthese und exogen zugeführtem Nahrungs-Kreatin, größer wird als der Bedarf des Organismus. Bei Gesunden mit intakter Nierenfunktion wird Kreatin nach oraler Gabe (Kreatintoleranztest) weitgehend im Muskel zurückgehalten, bei Patienten mit Muskelerkrankungen kommt es dagegen zu einer Hyperkreatinämie und vermehrter Kreatinurie (KOUFEN und CONSRUCH 1972). Bei längerdauernder oraler Zufuhr von Kreatin in Höhe des normalen Tagesbedarfs vermindert sich, bei Patienten mit bereits initial erhöhter Kreatinausscheidung, das Harn-Kreatin an den folgenden Tagen, in einigen Fällen anhaltend (BERNHARDT 1977).

Da die spontane Bildung von Kreatinin nur vom Kreatin-gehalt des Muskels und der Muskelmasse des Körpers abhängig ist, stellt die Ausscheidung von Kreatinin bei normaler Nierenfunktion eine "individuelle Konstante" des Menschen dar (KARLSON 1974). Diese relative Konstanz der Kreatininurie wird häufig zur Überprüfung der Zuverlässigkeit von 24-Stunden-Urinsammlungen herangezogen, da diese - insbesondere bei ambulanten Patienten - oftmals unvollständig sind (RICHTERICH und COLOMBO 1978). Hingegen wird in verschiedenen anderen Studien von Abweichungen bis zu 30 % (von Tag zu Tag) berichtet und auch die Meinung vertreten, die Ausscheidung von Kreatinin sei ebenso variabel wie die der anderen Harnkomponenten (MACK und MONTGOMERY 1973, et al.). Auch für den Serumkreatininspiegel sind Tagesschwankungen bekannt, mit niedrigsten Werten in den Morgenstunden (STAMM 1967).

Die tägliche Kreatininausscheidung wird für Männer mit 1 bis 2 g, für Frauen mit 0,8 bis 1,8 g angegeben (CANTAROW und TRUMPER 1975). Neben diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden ließ sich zeigen, daß die Kreatininausscheidung im Altersgang mit der Entwicklung und Rückbildung der Muskulatur parallel verläuft (AHLERT et al. 1967). Sie

soll aber von der Ernährung, der körperlichen Aktivität und der Diurese weitgehend unabhängig sein (RICHTERICH und COLOMBO 1978). Keineswegs gleichlautend sind aber auch hierzu die Angaben einzelner Autoren. So wirkte sich in mehreren Untersuchungen strikte Bettruhe auf die Ausscheidung von Kreatinin im Harn kaum aus, während in einer anderen Studie ein signifikanter Anstieg beobachtet wurde. Letzterer wurde auf Streßfaktoren im Zusammenhang mit der Immobilisation zurückgeführt, da bekannt ist, daß Streß Muskelkontraktionen hervorrufen kann, die wiederum eine Zunahme des Harn-Kreatinins verursachen (MACK und MONTGOMERY 1973). Der Zusammenhang zwischen Muskelmasse und Kreatininausscheidung wird mit Hilfe des Kreatininkoeffizienten ausgedrückt. Er gibt die Menge Kreatinin in Milligramm an, die je Kilogramm Körpermasse in 24 Stunden ausgeschieden wird. Normalwerte liegen für Männer bei 20 - 26 und für Frauen bei 14 - 22. Es wird vorgeschlagen, hierfür besser den Ausdruck "Kreatinin / cm Körpergröße / 24 Stunden" zu berechnen, da sich hierbei Veränderungen im Fettdepot nicht auf die Werte auswirken können (MACK und MONTGOMERY 1973).

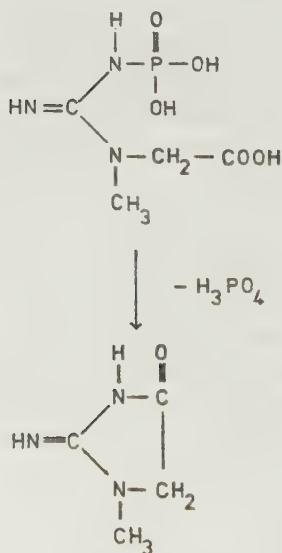


Abb. 2.02

Spontane Zyklisierung von Kreatinphosphat zu Kreatinin.

3. Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin

Die heute gebräuchlichen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die nichtenzymatischen und die enzymatischen Testverfahren. Nichtenzymatische Verfahren sind seit der Jahrhundertwende bekannt. Da sie relativ unspezifisch auf Kreatin sind, wurden seit ihrer Entwicklung unzählige Verbesserungen vorgeschlagen. Die Mehrzahl der Untersucher, die sich mit dem Thema "Kreatin" aus medizinischer oder biologischer Sicht befaßt haben, benutzten solche Testverfahren zur Kreatinbestimmung. Aus diesen und aus historischen Gründen sollen die nichtenzymatischen Methoden kurz vorgestellt werden. Erst in der zweiten Hälfte dieses Jahrhunderts wurden die spezifischen enzymatischen Testverfahren beschrieben. Sie haben sich aber bisher noch nicht durchsetzen können.

3.1. Nichtenzymatische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin im Serum

3.1.1. Photometrische Bestimmung von Kreatin als Kreatinin nach vorangegangener Zyklisierung im sauren Milieu in der Wärme

Die indirekten Methoden zur Kreatinbestimmung benutzen die Eigenschaft des Kreatins, sich in saurem Milieu in der Wärme in Kreatinin umzuwandeln. Kreatinin läßt sich mit der Jaffé-Methode relativ leicht, wenn auch keineswegs spezifisch bestimmen (4.1.2.). Große Anstrengungen wurden deshalb unternommen, um das in der Serumprobe vorhandene Kreatin ohne Verluste in Kreatinin zu überführen. Bei der im Anschluß an die Zyklisierung durchzuführenden Kreatininbestimmung werden sowohl das ursprünglich vorhandene (präformiertes Kreatinin), wie auch das gebildete Kreatinin gemeinsam gemessen. Die wahre Kreatinkonzentration errechnet sich aus der Differenz des so ermittelten Meßwertes und dem für das präformierte Kreatinin. Wegen der unterschiedlichen Molekulargewichte für Kreatin (131,14) und Kreatinin (113,12)

muß das Ergebnis für Kreatin bei Angabe in mg/100 ml korrigiert werden (Faktor 1,159).

TAUSSKY beschrieb 1956 eine verbesserte, aber sehr aufwendige Methode, bei der Serum nach 5minütiger Behandlung mit schwefelsaurer Jod-Kaliumjodid-Lösung durch Natriumwolframat enteiweißt wird. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand mit Chloroform ausgeschüttelt und die wäßrige Phase mit Zinkgranulat versetzt, wobei für etwa 40 min eine Wasserstoffentwicklung eintritt. Das pH der Lösung steigt dabei von 1 auf 2,0 - 2,5. Dieses Verfahren soll einerseits eine Mitfällung von Kreatin und Kreatinin verhindern, andererseits die spätere vollständige Umwandlung von Kreatin in Kreatinin ermöglichen. Nach dem Abfiltrieren wird mit einem Teil des Filtrats eine Kreatininbestimmung durchgeführt, wobei man nach der Zugabe von Pikrinsäure mit Äther ausschütteln soll. Zur Farbentwicklung wird die wäßrige Phase mit Natronlauge und EDTA versetzt. Den anderen Teil des Filtrats dampft man zur Umwandlung des Kreatins mit Pikrinsäure im kochenden Wasserbad eine Stunde lang ein. Nach dem Abkühlen wird die verdünnte wäßrige Lösung mit Äther ausgeschüttelt und zur wäßrigen Phase NaOH und EDTA hinzugefügt. Die Farbentwicklung kann dann photometrisch bestimmt werden (TAUSSKY 1956).

Eine weit einfachere Halbmikromethode beschrieb neuerdings eine italienische Forschergruppe (COMI et al. 1978). Sie benötigen nur 0,300 ml Blut aus der Fingerbeere, wobei die Gerinnung in der Pipette durch EDTA verhindert wird. Nach Verdünnen der Probe mit physiologischer Kochsalz-Lösung enteiweißen sie mit H_2SO_4 und Na_2WO_4 (FOLIN-WU). Im Anschluß an 10minütiges Zentrifugieren (2500 U/min) wird der klare Überstand mit Pikrinsäure und Natronlauge versetzt und zur Farbentwicklung 20 min bei 30°C stehengelassen. Bei 500 nm kann dann die Extinktion E_a für Kreatinin abgelesen werden. Nun wird die Probe 20 min im Wasserbad gekocht, um Kreatin in Kreatinin zu überführen. Anschließend bestimmt man die Extinktion E_b für das transformierte Kreatinin. Der Krea-

tin-Koeffizient berechnet sich nach: $I.C. = \frac{E_b - E_a}{E_a}$
 (I.C. = Indice creatinico)

3.1.2. Photometrische Bestimmung von Kreatin mit Hilfe der Diacetyl-Reaktion

Kreatin bildet mit Diacetyl (2,3-Butandion) und α -Naphthol in alkalischer Lösung einen roten Farbstoff, der bei 546 nm gut photometriert werden kann (BARRITT-Reaktion). Die Diacetyl-Reaktion ist im alkalischen Milieu spezifisch auf die Guanidino-Gruppe $-NH \cdot C(NH) \cdot NH_2$, im sauren Milieu aber spezifisch auf die Carbamino-Gruppe $-NH \cdot CO \cdot NH_2$. Die Farbstoffbildung mit der Guanidino-Gruppe wird durch Zusatz von α -Naphthol, die Farbstoffbildung mit der Carbamino-Gruppe durch Zusatz von aromatischen Aminen verstärkt (KANIG 1957). Kreatinin ergibt diese Reaktion nicht, wohingegen Arginin, Glycocyamin und Guanidin eine -wenn auch schwächere- Farbreaktion zeigen. Zur Enteiweißung von Serum ist Perchlorsäure geeignet, da sie weder die Farbentwicklung stört noch das Serum-Kreatin zu Kreatinin zyklisiert. Wiederfindungsversuche ergaben im Mittel 96,2% bei Seren von Frauen und 95,7% bei Seren von Männern (LAUBER 1966). Die von LAUBER beschriebene Analysenvorschrift wurde von BERNHARDT (1977) als Routinemethode übernommen.

Eine Adaptation der Diacetyl-Reaktion auf den AutoAnalyzer ist 1964 von GRIFFITHS beschrieben worden. Die Serumproben werden hier gegen destilliertes Wasser dialysiert, so daß eine Enteiweißung entfallen kann. Wiederfindungsversuche erbrachten durchschnittlich 96% des der Probe zugesetzten Kreatins. Durch Dialyse gegen physiologische Kochsalz-Lösung und eine Senkung der Reaktionstemperatur auf $+ 7,5^{\circ}C$ (Kühlthermostat) konnte die AutoAnalyzer-Technik weiter verbessert werden. Die Wiederfindungsquoten bei Serum und Harn lagen im Mittel bei 100% (GUNDLACH, HOPPE-SEYLER und JOHANN 1968).

3.2. Enzymatische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin im Serum

TANZER und GILVARG stellten 1959 im Journal of Biological Chemistry erstmals eine enzymatische Methode zur quantitativen Analyse von Kreatin in biologischem Material vor. Da Kreatin das Substrat nur eines einzigen gut charakterisierten Enzyms ist, muß zu seiner spezifischen Bestimmung die Creatin-Kinase verwendet werden. Durch Kopplung der Creatin-Kinase (Reaktion 1) mit Pyruvat-Kinase (Reaktion 2) und Lactat-Dehydrogenase (Reaktion 3) erhielten TANZER und GILVARG eine Summenreaktion (4), in welcher die Bildung von Kreatinphosphat aus Kreatin von der Oxidation einer äquimolaren Menge DPNH (NADH) begleitet ist. Unter den benutzten Bedingungen läuft die Reaktion (4) praktisch bis zum Ende ab, und der Extinktionswechsel bei 340 nm kann zur Berechnung der Kreatinkonzentration im Testansatz herangezogen werden.

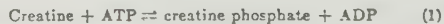
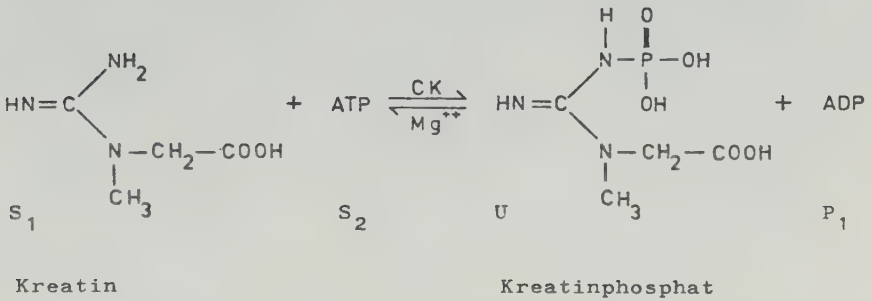
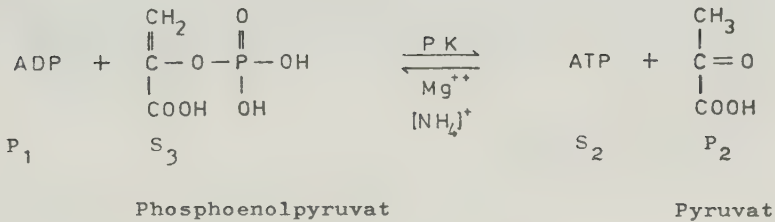
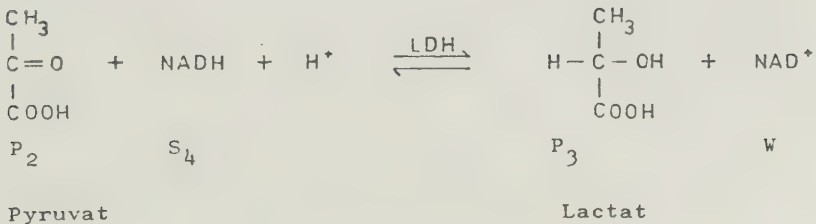


Abb. 3.01

aus TANZER und GILVARG (1959)

Alle bisher beschriebenen Methoden zur enzymatischen Kreatinbestimmung folgen dem von TANZER und GILVARG beschriebenen Reaktionsprinzip. Es handelt sich dabei stets um Endwert-Messungen mit gekoppelten Reaktionen, wobei die Indikator-Reaktion nachgeschaltet ist. Ihre Spezifität erhalten die Reaktions-Ketten durch das Enzym Creatin-Kinase (Abb. 3.02).

Reaktionsprinzip für die enzymatische Kreatinbestimmung1) Primär-Reaktion2) Hilfs-Reaktion3) Indikator-Reaktion

3.2.1. Methode nach TANZER und GILVARG (1959)

In ihrer Arbeit wiesen die Autoren darauf hin, daß im Serum vorhandenes Pyruvat das NADH des Testsystems gänzlich oxidieren kann. Sie führten deshalb eine Ionenaustauschchromatographie zur Trennung von Kreatin und Pyruvat durch. Dieser Schritt verlief quantitativ und schaffte zudem eine Möglichkeit das Serum-Kreatin zu konzentrieren. Weitere Störungen des Tests wurden nur noch in Gegenwart größerer Mengen von Glycocyamin beobachtet. Kreatinin, Arginin, Citrullin, Ureidosuccinat, Canavarin und Glycocyanidine beeinflussten die Kreatinbestimmung nicht. Bei einer Stoffmen- genkonzentration von 2,40 mmol/l war die gemessene Reak- tionsgeschwindigkeit der Creatin-Kinase mit Kreatin 240mal größer als mit Glycocyamin. Unter den angegebenen Bedin- gungen und den geringen Kreatinkonzentrationen ist die Ki- netik die einer unimolekularen Reaktion. Daher ist die Zeit, die für einen vollständigen Umsatz (99%ige Umsetzung von Kreatin zu Kreatinphosphat) benötigt wird, unabhängig von der Kreatinkonzentration.

Durchführung des Tests:

1 ml einer Dowex 50-H⁺-Säule wird mit 10 ml Serum beschickt. Anschließend wird das Serum-Kreatin mit einer 5 N NH₄OH- Lösung quantitativ aus der Säule eluiert und die Lösung zur Trockne eingedampft. Der Rückstand kann in einem bekannten Volumen Wasser aufgelöst und enzymatisch bestimmt werden. Das Gesamtvolumen in der Küvette beträgt 3,0 ml. Eine Pi- pettiervorschrift wird nicht angegeben.

Da uns keine Dowex 50-H⁺-Säule zur Verfügung stand, wurde die von TANZER und GILVARG vorgeschlagene Methode nicht in den experimentellen Methodenvergleich einbezogen. Es ist auch zu bezweifeln, daß eine so aufwendige Vorbereitung der Proben für Routineuntersuchungen geeignet ist.

Testbedingungen in der Küvette 3,0 ml

STOFF	μmol	mmol/l
Kreatin-Standard	0,200	0,067
Glycin-Puffer pH = 9,0	150,000	50,000
MgCl ₂	1,000	0,333
NADH	0,320	0,107
ATP	1,000	0,333
PEP	2,000	0,667
LDH 27 U/mg	0,648 U	216,000 U/l
PK 21 U/mg	1,260 U	420,000 U/l
CK 130 U/mg	130,000 U	43333,333 U/l

Tab. 3.01

3.2.2. Methode nach KIBRICK und MILHORAT (1966)

Die beiden Autoren aus dem "Institute for Muscle Disease" in New York waren nicht von der Meinung von TANZER und GILVARG überzeugt, daß allein die Anwesenheit von Pyruvat im Serum die direkte enzymatische Kreatinbestimmung unmöglich machte. Sie schlugen deshalb ein anderes Verfahren zur Probenvorbereitung vor. Um ohne Ionenaustauscher auszukommen, versuchten sie den Einfluß der Brenztraubensäure durch die Behandlung des Serums mit einer Jod-Kaliumjodid-Lösung - wahrscheinlich durch Oxidation - zu eliminieren. Anschließend erfolgte die Enteiweißung der Probe mit Bariumhydroxid und Zinksulfat (SOMOGYI-Reagenzien). Eine zusätzliche dreimalige Extraktion des wäßrigen Überstands mit Chloroform konnte wieder aufgegeben werden; sie brachte keine Vorteile für die Kreatinbestimmung.

Notwendige Geräte: Photometer; Filter 340, 334 oder 365 nm; Laborzentrifuge; Zentrifugengläser; Gummistopfen; Pipetten 6, 5, 3, 1, 0,500, 0,200 und 0,020 ml; Meßkölbchen 2000, 1000, 100, 50, 10 und 5 ml; pH-Meter; große Küvetten.

Notwendige Reagenzien:

1. Jod, Suprapur, MERCK 4763
2. Kaliumjodid, Suprapur, MERCK 5044
3. Bariumhydroxid, $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, z. A., MERCK 1737
4. Zinksulfat-7-hydrat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, z. A., MERCK 8883
5. Glycin, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, z. A., MERCK 4201
6. 0,2 N Natronlauge, NaOH, MERCK 9140
7. Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, z. A., MERCK 5833
8. Adenosin-5'-triphosphat, ATP, kristallisiertes Dinatriumsalz
9. β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH), reduziertes Dinatriumsalz
10. Phosphoenolpyruvat, PEP, kristallisiertes Tricyclohexylammoniumsalz
11. Lactat-Dehydrogenase, LDH, aus Kaninchen-Skelettmuskel kristallisiert, Suspension in 3,2 M Ammonium-

- sulfat-Lösung; ≥ 550 U/mg (25°C)
12. Pyruvat-Kinase, PK, aus Kaninchen-Skelettmuskel kristallisiert, Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung; ≥ 200 U/mg (25°C)
 13. Creatin-Kinase, CK, aus Kaninchen-Skelettmuskel, lyophilisiert; ≥ 25 U/mg (25°C)
 14. Kreatin (Monohydrat) reinst, MERCK 5205
 15. frisches destilliertes Wasser

Herstellung der Lösungen:

I. Jod-Kaliumjodid-Lösung, 1 l:

6,4 g Jod und 13,0 g Kaliumjodid in 40 ml H_2O dest. lösen und rühren bis alle Kristalle gelöst sind. Dann auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen. (Bei Zimmertemperatur unbegrenzt in brauner Flasche haltbar; für 1000 Bestimmungen)

II. Bariumhydroxid-Lösung, 2 l:

142,5 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ in 1500 ml kochendem H_2O dest. lösen. Gefäß zum Abkühlen mit einem Gaze-Bausch verschließen, dann bei Raumtemperatur auf 2000 ml mit frisch destilliertem Wasser verdünnen. Falls notwendig die Lösung filtrieren.

(Bei Raumtemperatur unbegrenzt in Polyäthylenflasche haltbar; für 333 Bestimmungen)

III. Zinksulfat-Lösung, 495 ml:

158,5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in Wasser lösen und auf 500 ml auffüllen. Eine 5,0 ml Probe hiervon mit H_2O dest. verdünnt muß mit 20,0 ml der Bariumhydroxid-Lösung (II) autitriert werden können (Phenolphthalein als Indikator).

Arbeits-Lösung: Zu 100 ml der Zinksulfat-Stamm-Lösung werden weitere 10 ml H_2O dest. gegeben.

(Beide Lösungen sind bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar; für 330 Bestimmungen)

IV. Glycin-Puffer, 0,45 mol/l, 100 ml:

3,378 g Glycin mit 30 ml destilliertem Wasser und 42,0 ml 0,2 N NaOH-Lösung mischen. Mittels eines pH-Meters auf $\text{pH} = 9,0$ einstellen; hierzu 0,2 N HCl-

Lösung bzw. 0,2 N NaOH-Lösung soweit benötigt hinzufügen. Anschließend auf 100 ml mit H_2O dest. auffüllen. Den pH-Wert überprüfen und falls erforderlich nochmals einstellen.

(Lösung bei $+ 4^\circ\text{C}$ zwei Wochen haltbar; für 145 Best.)

V. Magnesiumchlorid-Lösung, 0,02 mol/l, 50 ml:

10 ml einer 0,1 mol/l MgCl_2 -Lösung (0,952 g/100 ml) auf 50 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.

(Lösung bei $+ 4^\circ\text{C}$ zwei Wochen haltbar; für 480 Best.)

Abweichend von der Originalvorschrift wurde hier $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Mol.-Gew. 203,31) benutzt. Es wurden deshalb 10 ml einer 0,1 mol/l MgCl_2 -Lösung (2,033 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ /100 ml) auf 50 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

VI. Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz-Tetrahydrat (ATP), Mol.-Gew. 623, 5 ml:

124,6 mg ATP in 5 ml destilliertem Wasser lösen.

(Lösung bei $+ 4^\circ\text{C}$ eine Woche haltbar; für 96 Best.)

Abweichend von der Originalvorschrift wurde hier ATP als kristallisiertes Dinatriumsalz-Trihydrat (Mol.-Gew. 605,2) eingesetzt. Entsprechend wurden hiervon 121 mg in 5 ml H_2O dest. gelöst (0,04 mol/l).

VII. β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, 6,37 mmol/l, 10 ml:

45,2 mg NADH in 10 ml destilliertem Wasser lösen.

(Lösung im Gefrierschrank eine Woche haltbar; für 96 Bestimmungen)

VIII. 2-Phosphoenolpyruvat, kristallisiertes Trinatriumsalz, Dihydrat, Mol.-Gew. 270, 5 ml:

107,0 mg PEP in 5 ml Wasser lösen.

(Lösung im Gefrierschrank eine Woche haltbar; für 96 Bestimmungen)

Abweichend von der Originalvorschrift wurde hier Phosphoenolpyruvat als kristallisiertes Tricyclohexylammoniumsalz (Mol.-Gew. 465,3) verwendet. Es wurden deshalb 184,4 mg davon in 5 ml H_2O dest. gelöst (79,3 mmol/l).

IX. Reagenzien-Mischung:

Glycin-Puffer	0,45	mol/l	33,0 ml
MgCl ₂ -Lösung	0,02	mol/l	5,0 ml
ATP-Lösung	0,04	mol/l	2,5 ml
NADH-Lösung	6,37	mmol/l	5,0 ml
PEP-Lösung	0,08	mol/l	2,5 ml
			48,0 ml

Die Reagenzien-Mischung ist bei + 4 °C etwa eine Woche haltbar. Die Lösung ist ausreichend für 48 Bestimmungen.

X. LDH/PK-Mischung, 0,54 ml:

Lactat-Dehydrogenase (5 mg/ml)	0,24 ml
Pyruvat-Kinase (10 mg/ml)	<u>0,30 ml</u>
LDH/PK-Mischung	0,54 ml

20 µl der Enzym-Mischung enthalten 0,044 mg LDH und 0,110 mg PK.

(Lösung im Gefrierschrank eine Woche haltbar; für 27 Bestimmungen)

XI. Glycin-Puffer, 0,01 mol/l, 9 ml:

0,2 ml Glycin-Puffer, 0,45 mol/l (IV) mit 8,8 ml destilliertem Wasser verdünnen. Täglich ansetzen und pH-Wert auf pH = 9,0 einstellen.

(Einen Tag haltbar; für 45 Bestimmungen)

XII. CK-Lösung, 1 ml:

20 mg Creatin-Kinase in 1 ml Glycin-Puffer, 0,01 mol/l (XI) lösen. Lyophilisat im Gefrierschrank aufbewahren und erst direkt vor Gebrauch auflösen.

(Für 5 Bestimmungen)

XIII. Kreatin-Standard-Lösung, 0,8 mg/100 ml:

Stamm-Lösung: 100 mg Kreatin (wasserfrei) in 100 ml destilliertem Wasser lösen. In kleine Gefäße abfüllen und einfrieren. Einen Monat stabil.

Arbeits-Lösung, 8 µg/ml: 8 ml verdünnte Stamm-Lösung (1 ml Stamm-Lösung/100 ml) mit 2 ml destilliertem Wasser verdünnen. Täglich zubereiten.

(Für insgesamt 6250 Bestimmungen)

Testbedingungen in der Küvette 6,220 ml

STOFF	μmol	mmol/l
Kreatin-Standard 8 $\mu\text{g/ml}$	0,053	0,0085
Glycin-Puffer pH = 9,0	311,375	50,060
MgCl ₂	2,083	0,335
ATP	2,083	0,335
NADH	0,664	0,107
PEP	4,130	0,664
LDH 550 U/mg	24,444 U	3929,975 U/l
PK 200 U/mg	22,222 U	3572,705 U/l
CK 25 U/mg	100,000 U	16077,170 U/l

Tab. 3.02Durchführung des Tests:

In ein Zentrifugenglas werden 3 ml des zu bestimmenden Serums und 1 ml der Jod-Kaliumjodid-Lösung pipettiert. Nach mehrmaligem Schütteln läßt man das Gläschen 5 min stehen. In ein weiteres Zentrifugengläschen gibt man 2 ml der Kreatin-Standard-Lösung und 2 ml destilliertes Wasser. Zur Enteiweißung werden zu den Röhrcheninhalten 6 ml Bariumhydroxid-Lösung hinzugefügt und mit dem Rotationsmischer gemischt. Anschließend gibt man 1,5 ml der Zinksulfat-Lösung dazu und mischt nochmals. Es bildet sich sofort ein dichter weißer Niederschlag. Die Röhrchen werden mit Gummistopfen verschlossen, mehrmals kräftig geschüttelt und dann 10 min stehengelassen. Nach letztmaligem Schütteln muß man die unverschlossenen Zentrifugengläser 20 min bei 2000 U/min zentrifugieren (unter Kühlung auf etwa + 4°C). Danach werden

jeweils 5 ml des klaren Überstands in Küvetten gefüllt und 1 ml der Reagenzien-Mischung (IX) sowie 0,020 ml der LDH/PK-Mischung (X) dazugemischt. Die Extinktionsablesung erfolgt bei 340 nm gegen Wasser (hier: bei 334 nm gegen Luft). Nach der Originalvorschrift sollen die Extinktionen in Abständen von jeweils 10 min bis zur Konstanz (E_1) überprüft werden. 20 min nach dem Zumischen von je 0,200 ml Creatin-Kinase-Lösung (XII) werden die Extinktionen nochmals abgelesen. Die erhaltenen Werte sind für die einzelnen Proben E_2 . Mit der Kreatin-Standard-Lösung (0,8 mg/100 ml) wird so wie mit Serum verfahren, jedoch unterbleibt die Behandlung mit Jod-Kaliumjodid-Lösung.

Für die Berechnung der Kreatinkonzentrationen sollen die Extinktionen E_1 wegen der, durch die spätere CK-Zugabe bedingten Volumenzunahme mit dem Faktor 0,968 (6,02/6,22) korrigiert werden. Die Kreatinkonzentration im Serum berechnet sich nach:

$$c_{\text{Kreatin}} (\mu\text{g/ml}) = \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \cdot 5,33$$

$$\Delta E = 0,968 \cdot E_1 - E_2$$

Der Faktor 5,33 ergibt sich aus:

$$8 (\mu\text{g/ml Standard}) \cdot \frac{2 (\text{ml Standard})}{3 (\text{ml Serum})} = 5,33$$

Nach den Angaben von KIBRICK und MILHORAT zeigten 20 Wiederfindungsversuche, daß 86 bis 110 % des zugesetzten Kreatins gefunden wurden. Die Probe konnte ohne Beeinträchtigung der Kreatinbestimmung bis zu 3,3 mg Pyruvat/100 ml Serum enthalten.

Eigene Versuche:

Nach anfänglichen Versuchen, die der Originalvorschrift streng folgten, war es möglich den gesamten Testansatz zu halbieren. Leider ergab sich nach dem Zentrifugieren, daß

recht oft Flöckchen des Niederschlags der Glaswand der Röhrchen leicht lösbar anhafteten oder auf der Flüssigkeitsoberfläche flottierten. Der eiweißfreie Überstand mußte deshalb nach dem Abpipettieren nochmals für 3 min in der Tischzentrifuge nachzentrifugiert werden. Zentrifugenröhrchen aus Glas waren schlecht vom weißen Niederschlag (BaSO_4) zu reinigen, es wurden deshalb Einmal-Kunststoffröhrchen verwendet.

Durch die Kurvenaufzeichnung mit dem Kompensationsschreiber konnte die Extinktionsänderung ΔE graphisch ermittelt werden und eine Korrektur der Ausgangsextinktion E_1 entfallen. Die Berechnung der Kreatinkonzentration im Serum kann mit Hilfe von mitgeführten wäßrigen Standards oder nach

$$c = \Delta E \cdot \frac{131,14}{3,441 \cdot 10} \cdot \frac{5 + 1 + 0,02 + 0,10}{5} \cdot \frac{11,5}{3}$$

$$c = \Delta E \cdot 17,882 \quad \text{mg/100 ml Serum (bei } \lambda = 365 \text{ nm)}$$

erfolgen. Beide Arten der Auswertung sind gut durchführbar, und die Unterschiede im Ergebnis sind nur gering. Die geringeren Abweichungen vom Sollwert wurden aber bei der Berechnung der Kreatinkonzentration mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten gefunden.

Die Serienuntersuchung erfolgte mit 10 Pool-Seren und 30 aufgestockten Pool-Seren. Alle Proben wurden einzeln allen Bearbeitungsschritten unterzogen. Die erzielten Ergebnisse sind der Tabelle 3.03 zu entnehmen.

Serienuntersuchung: Kreatin im Serum

Kreatin	Pool	Pool + 0,5		Pool + 1,0		Pool + 2,0	
	mg/100ml	mg/100ml		mg/100ml		mg/100ml	
		Diff.		Diff.		Diff.	
I	0,63	1,14	0,51	1,56	0,93	2,47	1,84
II	0,62	1,13	0,51	1,50	0,88	2,49	1,87
III	0,59	1,11	0,52	1,52	0,93	2,47	1,88
IV	0,64	1,11	0,47	1,60	0,96	2,52	1,88
V	0,66	1,13	0,47	1,59	0,93	2,54	1,88
VI	0,63	1,11	0,48	1,56	0,93	2,54	1,91
VII	0,63	1,06	0,43	1,61	0,98	2,52	1,89
VIII	0,61	1,07	0,46	1,50	0,89	2,54	1,93
IX	0,59	1,06	0,47	1,52	0,93	2,45	1,86
X	0,61	1,10	0,49	1,59	0,98	2,52	1,91

n = 10

$\bar{x}$	0,62	1,10	0,48	1,56	0,93	2,51	1,89
s	0,022	0,029	0,027	0,042	0,033	0,033	0,026
VK %	3,54	2,64		2,69		1,31	
Wieder-			0,48		0,94		1,89
findung			96,0 %		94,0 %		94,5 %
R %			- 4,0		- 6,0		- 5,5
+ 3s	0,69	1,19		1,69		2,61	
- 3s	0,55	1,01		1,43		2,41	

Tab. 3.03

Die Kreatinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten berechnet.

3.2.3. Methode nach BERLET (1968)

Das von TANZER und GILVARG vorgeschlagene Verfahren zur Kreatinbestimmung erwies sich für neurologische Routineuntersuchungen als wenig geeignet. Im Jahre 1968 stellte deshalb BERLET (Heidelberg) eine neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Kreatin im Serum und im Liquor vor. In seinem Test wird Serum und Liquor mit Trichloressigsäure (TCA) enteiweißt und der wäßrige Überstand zur Extraktion der Säure 3mal mit Diäthyläther ausgeschüttelt. Die Ätherextraktion soll zudem den Vorteil besitzen, nur solche Serumbestandteile aus der Probe zu entfernen, die den Test hemmend beeinflussen.

Das Verfahren wird in der beschriebenen Form zur routinemäßigen Untersuchung von Serum und Liquor benutzt (BERLET 1968).

Notwendige Geräte: Photometer; Filter 365 oder 334 nm; Laborzentrifuge; Spitzröhrchen; 15ml-Zentrifugengläser mit Schliffstopfen; Pipetten 3, 2, 1, 0,500, 0,100, 0,020 und 0,010 ml; Standardküvetten; Küvettenthermostateinrichtung.

Notwendige Reagenzien:

1. Trichloressigsäure-Lösung 20 %, z. A., MERCK 9415
2. Diäthyläther, getrocknet z. A., MERCK 929
3. Glycin, z. A., MERCK 4201
4. Magnesiumchlorid, z. A., MERCK 5833
5. Phosphoenolpyruvat, PEP, kristallisiertes Tricyclohexylammoniumsalz
6. Adenosintriphosphat, ATP, kristallisiertes Dinatriumsalz
7. β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH), reduziertes Dinatriumsalz
8. Lactat-Dehydrogenase, LDH, aus Kaninchen-Skelettmuskel kristallisiert, Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung; ≥ 550 U/mg (25°C)
9. Pyruvat-Kinase, PK, aus Kaninchen-Skelettmuskel kristallisiert, Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-

Lösung; $\geq 200 \text{ U/mg}$ (25°C)

10. Creatin-Kinase, CK, aus Kaninchen-Skelettmuskel, lyophilisiert; $\geq 25 \text{ U/mg}$ (25°C)
11. Ammoniumsulfat, z. A., MERCK 1217
12. Kreatin (Monohydrat) reinst, MERCK 5205
13. frisches destilliertes Wasser

Herstellung der Lösungen:

Es wurden vom Autor nur wenige Volumina und die Konzentrationen im Test angegeben. Die benötigten Lösungen wurden in der folgenden Weise für etwa 100 Bestimmungen angesetzt:

I. Glycin-Puffer, 0,1 mol/l, 100 ml:

0,751 g Glycin in 60 ml destilliertem Wasser und 16 ml 0,1 mol/l NaOH-Lösung lösen und mit NaOH auf pH = 9 einstellen (pH-Meter). Auf 100 ml mit H_2O dest. auffüllen, pH-Wert kontrollieren und gegebenenfalls korrigieren.

II. Reagenzien-Mix (~158 Best.):

32 mg MgCl_2 (4), 166 mg PEP (5), 154 mg ATP (6) und 130 mg NADH in ca. 50 ml destilliertem Wasser lösen, gut mischen und mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.

III. Lactat-Dehydrogenase/Pyruvat-Kinase-Suspension:

1 ml der LDH-Suspension (8) und 0,5 ml der PK-Suspension (9) mit 3,2 mol/l Ammoniumsulfat-Lösung auf 2 ml auffüllen.

IV. CK-Lösung:

10 mg Creatin-Kinase-Lyophilisat in 10 ml 0,01 mol/l Glycin-Puffer (pH = 9) lösen.

Testbedingungen in der Küvette 2,750 ml

STOFF	μmol	mmol/l
Kreatin-Standard 1 mg/100 ml	0,057	0,0207
Glycin-Puffer pH = 9,0	101,000	36,727
Mg ⁺⁺	1,000	0,364
ATP	1,600	0,582
NADH	1,100	0,400
PEP	2,250	0,818
LDH 550 U/mg	27,500 U	10000,000 U/l
PK 200 U/mg	10,000 U	3636,364 U/l
CK 25 U/mg	2,500 U	909,091 U/l

Tab. 3.04Durchführung des Tests:

Bei dem hier durchgeführten Methodenvergleich wurden nur Verfahren zur Serumuntersuchung berücksichtigt, auf die Liquoranalyse wird deshalb nicht eingegangen.

Der vorliegende Test kann auch als Halbmikromethode durchgeführt werden. Dadurch läßt sich das benötigte Serumvolumen auf 0,750 ml vermindern, was einem wäßrigen Überstand nach Enteiweißung von 0,250 - 0,300 ml entspricht. Da die Testdurchführung auf Grund der Ätherextraktion schon recht schwierig ist, wurde die vorgeschlagene Makromethode benutzt.

In Zentrifugengläsern werden je 3 ml Serum mit 1 ml Trichloressigsäure-Lösung (20%ig) versetzt, gut geschüttelt und nach 10minütigem Stehen bei Raumtemperatur in einer

Laborzentrifuge zentrifugiert (3000 U/min). Von den wäßrigen Überständen überführt man jeweils 2 ml in 15ml-Zentrifugengläser mit Schliffstopfen, fügt 8 ml Äther hinzu und schüttelt die gut verschlossenen Gläser 2 min lang (mechanischer Schüttler). Die Ätherschichten werden dann entfernt und der Vorgang der Ätherextraktion noch zweimal wiederholt (insgesamt für 6 min). Anschließend werden je 1 ml der wäßrigen Phasen in Standardküvetten pipettiert. Da der Autor nur die Konzentrationen im Test und das Endvolumen (2,750 ml) angab, wurde im folgenden so verfahren: 'Zu 1 ml wäßrigem Extrakt werden 1 ml 0,1 mol/l Glycine-Puffer (I), 0,630 ml Reagenzien-Mix (II) und 0,020 ml LDH/PK-Suspension (III) hinzugefügt. Nach dem Mischen werden die Küvetten für 10 min bei 25°C im Küvettenwechselausw. belassen bis keine weiteren Extinktionsänderungen mehr erfolgen.' Die Meß-Reaktion wird dann durch das Einmischen von 0,100 ml CK-Lösung (IV) gestartet. Die Extinktionen müssen jeweils vor der CK-Zugabe sowie 15 und 20 min nach der CK-Zugabe abgelesen werden. Der anfängliche Extinktionssprung ist aus dem Reagenzienleerwert zu ermitteln. Der Leerwert wird wie die Proben behandelt, er enthält aber statt des wäßrigen Extrakts 1 ml destilliertes Wasser. Da offenbar die LDH-Reaktion beim alkalischen pH des Inkubationsmediums nicht vollständig abläuft, müssen die Kreatinkonzentrationen über Standardkurven berechnet werden. Ein Vergleich zwischen Standardkurven (wäßrige Kreatin-Lösungen) und Wiederfindungsversuchen mit Serum (aufgestockte Seren) ergab keine Kreatinverluste durch die Ätherextraktion. Als störend erwies sich die Anwesenheit von Pyruvat im Serum. Die Brenztraubensäure wird nur zum Teil durch die Ätherextraktion aus dem wäßrigen Überstand entfernt. Bei einer Konzentration von 3 mg Pyruvat/100 ml wäßriger Lösung wurden durch die Ätherbehandlung etwa 60 % aus dem Ansatz entfernt und etwa 95 % des Kreatins wiedergefunden. Die Standard-Kurve war im Bereich von 0 - 4 mg Kreatin/100 ml Serum linear (BERLET 1968).

Berechnung:

Meßstrahlung: 365 nm bzw. 334 nm

Die Berechnung der Kreatinkonzentration im Serum erfolgt über Standard-Kurven ("Fixed-time-Verfahren" mit Standard-Wert). Eine Temperaturkontrolle ist erforderlich.

$$c = \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \cdot c_{\text{Standard}} \quad \begin{array}{l} (\text{mmol/l}) \text{ bzw.} \\ (\text{mg}/100 \text{ ml}) \end{array}$$

Eigene Versuche:

Die Testdurchführung erwies sich als recht zeitraubend und umständlich. So traten nach 10minütigem Zentrifugieren - im Anschluß an die Enteiweißung - meist noch Schwebepartikel im wäßrigen Überstand auf, die ein nochmaliges Zentrifugieren erforderlich machten. Entgegen den Angaben in Tabelle 3.20 (Seite 114) dauerte das dreimalige Ausschütteln mit Äther wesentlich länger als 6 Minuten. Beim nachfolgenden Abpipettieren der wäßrigen Phase wurde ein ständiges Tropfen der Pipetten beobachtet. Dies war wohl auf die geringen Mengen an Äther zurückzuführen, die in der wäßrigen Phase verblieben. Die Löslichkeit von Äther in Wasser beträgt nämlich bei 25°C 6,4 g/100 ml (VOGEL und SYNOWIETZ 1974). Es war außerdem zu bedenken, daß ein Arbeiten mit Äther, wegen der leichten Entflammbarkeit der Dämpfe und der Bildung explosiver Gemische mit Luft, für den Routinebetrieb wenig geeignet ist. Hinzu kamen Probleme der Abfallbeseitigung, da allein bei der Verarbeitung einer einzigen Probe 24 ml verunreinigten Äthers anfielen. Aus diesen Gründen wurde die Serienuntersuchung nur mit der Hälfte der sonst verwendeten Seren durchgeführt. Bei der vorgeschriebenen CK-Konzentration von nur 0,1 mg Enzymprotein/Küvetteninhalt ($\hat{=}$ 2,5 U/2,750 ml) war das im Testsystem vorhandene Kreatin nach 25 min noch nicht gänzlich umgesetzt. Startete man dagegen die Meß-Reaktion mit 2,0 mg CK ($\hat{=}$ 50 U/2,750 ml), so ergab sich ein kompletter Kreatinumsatz mit inkonstantem Endwert.

Die Durchführung der Serienuntersuchung erfolgte mit 5 Pool-Seren und 15 aufgestockten Pool-Seren. Die Proben mit je 3 ml Serum wurden einzeln allen Bearbeitungsschritten unterzogen. Die Extinktionsänderungen konnten bei 365 nm mit Hilfe des Kompensationsschreibers aufgezeichnet werden. Eine genaue Einhaltung der Reaktionstemperatur von 25°C war stets gewährleistet. Da keine genaue Vorschrift vorlag, erfolgte die Berechnung der Kreatinkonzentration auf 4 Arten mit Hilfe von mitgeführten wäßrigen Kreatin-Standards (1,0 mg Kreatin/100 ml):

- 1) Reaktionszeit 15 min, wäßrige Standards Tab. 3.05 a)
- 2) Reaktionszeit 20 min, wäßrige Standards Tab. 3.05 b)
- 3) Reaktionszeit 15 min, wäßrige Standards wie Seren behandelt Tab. 3.05 c)
- 4) Reaktionszeit 20 min, wäßrige Standards wie Seren behandelt Tab. 3.05 d)

Da die Eichkurven bis 4 mg Kreatin/100 ml Serum linear verliefen, wurde für jede Serie nur ein Standard-Wert eingesetzt. Die Versuchsergebnisse sind aus den Tabellen 3.05 a) bis 3.05 d) zu ersehen. Die beobachteten Variationskoeffizienten lagen zwischen 7,5 % und 13,0 %. Die besten Ergebnisse bezüglich Präzision und Richtigkeit wurden in Gruppe 4) (Tab. 3.05 d)) gefunden. Es ist offensichtlich, daß sich die wäßrigen Standard-Lösungen und die Serumproben unterschiedlich im Test verhalten. Für die Standards lassen sich rechnerisch (mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten) gute Werte finden. Die Reaktionskurven der Seren zeigen nach 15 min und 20 min eine erhebliche Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit (inkonstanter Endwert), wobei die Kurven gekrümmt verlaufen. Deshalb werden meist höhere Kreatinkonzentrationen bei Ablesung der Extinktionen nach 20 min gefunden.

Serienuntersuchung: Kreatin im Serum1) Reaktionszeit 15 min, wäßrige Standards

Kreatin	Pool	Pool + 0,5		Pool + 1,0		Pool + 2,0	
	mg/100 ml	mg/100ml		mg/100ml		mg/100ml	
		Diff.		Diff.		Diff.	
I	0,87	1,23	0,36	2,06	1,19	3,23	2,36
II	0,73	1,21	0,48	1,67	0,94	2,42	1,69
III	0,85	1,44	0,59	2,10	1,25	3,25	2,40
IV	0,75	1,11	0,36	1,78	1,03	2,63	1,88
V	0,71	1,45	0,74	2,06	1,35	3,00	2,29

n = 5

$\bar{x}$	0,78	1,29	0,51	1,93	1,15	2,91	2,12
s	0,073	0,150	0,162	0,195	0,166	0,369	0,319
VK %	9,35	11,63		10,10		12,70	
Wieder-			0,51		1,15		2,12
findung			102,0 %		115,0 %		106,0 %
R %			+ 2,0		+ 15,0		+ 6,0
+ 3s	1,00	1,74		2,52		4,02	
- 3s	0,56	0,84		1,35		1,80	

Tab. 3.05 a)

2) Reaktionszeit 20 min, wäßrige Standards

Kreatin	Pool	Pool + 0,5		Pool + 1,0		Pool + 2,0	
	mg/100ml	mg/100ml		mg/100ml		mg/100ml	
		Diff.		Diff.		Diff.	
I	0,89	1,32	0,43	2,19	1,30	3,41	2,52
II	0,79	1,31	0,52	1,82	1,03	2,65	1,86
III	0,86	1,50	0,64	2,21	1,35	3,35	2,49
IV	0,72	1,15	0,43	1,81	1,09	2,70	1,98
V	0,78	1,48	0,70	2,08	1,30	3,11	2,33

n = 5

$\bar{x}$	0,81	1,35	0,54	2,02	1,21	3,04	2,24
s	0,068	0,143	0,123	0,195	0,144	0,355	0,300
VK %	8,40	10,59		9,65		11,68	
Wieder-			0,54		1,21		2,24
findung			108,0 %		121,0 %		112,0 %
R %			+ 8,0		+ 21,0		+ 12,0
+ 3s	1,01	1,78		2,61		4,11	
- 3s	0,61	0,92		1,44		1,98	

Tab. 3.05 b)

3) Reaktionszeit 15 min, wäßrige Standards wie Seren
behandelt

	Pool	Pool + 0,5		Pool + 1,0		Pool + 2,0	
Kreatin	mg/100ml	mg/100ml		mg/100ml		mg/100ml	
		Diff.		Diff.		Diff.	
I	0,79	1,12	0,33	1,38	1,09	2,94	2,15
II	0,67	1,10	0,43	1,52	0,85	2,20	1,53
III	0,78	1,33	0,55	1,94	1,16	3,00	2,22
IV	0,68	1,01	0,33	1,63	0,95	2,40	1,72
V	0,65	1,32	0,67	1,88	1,23	2,74	2,09
n = 5							
$\bar{x}$	0,71	1,18	0,46	1,77	1,06	2,66	1,94
s	0,066	0,142	0,147	0,184	0,155	0,346	0,301
VK %	9,30	12,03		10,40		13,01	
Wieder-			0,47		1,06		1,95
findung			94,0 %		106,0 %		97,5 %
R %			- 6,0		+ 6,0		- 2,5
+ 3s	0,91	1,61		2,32		3,70	
- 3s	0,51	0,75		1,22		1,62	

Tab. 3.05 c)

4) Reaktionszeit 20 min, wäßrige Standards wie Seren
behandelt

Kreatin	Pool	Pool + 0,5		Pool + 1,0		Pool + 2,0	
	mg/100ml	mg/100ml	Diff.	mg/100ml	Diff.	mg/100ml	Diff.
I	0,78	1,20	0,42	1,98	1,20	3,07	2,29
II	0,71	1,19	0,48	1,65	0,94	2,41	1,70
III	0,78	1,35	0,57	1,99	1,21	3,01	2,23
IV	0,65	1,04	0,39	1,63	0,98	2,43	1,78
V	0,71	1,34	0,63	1,88	1,17	2,80	2,09
n = 5							
$\bar{x}$	0,73	1,22	0,50	1,83	1,10	2,74	2,02
s	0,055	0,127	0,101	0,175	0,129	0,312	0,265
VK %	7,53	10,41		9,56		11,39	
Wieder-			0,49		1,10		2,01
findung			98,0 %		110,0 %		100,5 %
R %			- 2,0		+ 10,0		+ 0,5
+ 3s	0,90	1,60		2,36		3,68	
- 3s	0,57	0,84		1,31		1,80	

Tab. 3.05 d)

3.2.4. Methode nach BERNT, BERGMAYER und MÖLLERING (1974)

Die Autoren beschrieben einen enzymatischen Testansatz, der für 20 Bestimmungen ausgelegt ist. Zur Messung wird ein pH-Wert nicht unter 9 empfohlen, da das Gleichgewicht der Reaktion nur im alkalischen Bereich zugunsten von Kreatinphosphat liegt. Relativ große Enzym-Mengen werden benötigt, um die Reaktion einigermaßen schnell ablaufen zu lassen (ca. 3 mg CK/Testansatz). Eine zu geringe CK-Aktivität führt zu niedrigeren Kreatin-Werten; mit 1,5 mg CK/Testansatz ergaben Wiederfindungsversuche nur 80 % des eingesetzten Kreatins. Pyruvat braucht vor der enzymatischen Bestimmung nicht mit Ionenaustauschern entfernt zu werden; zudem kann dies leicht zu Kreatin-Verlusten führen (BERNT, BERGMAYER und MÖLLERING 1974).

Die Vorschrift wurde auch zur Mikroanalysenmethode verändert. Sie soll bei der Kreatinbestimmung in biotisch gewonnenem Untersuchungsmaterial gute Ergebnisse liefern (PETZOLD und WENDELIN 1976).

Notwendige Geräte: Photometer; Filter 340, 334 oder 365 nm; Laborzentrifuge; Eisbad; Filter; Spitzröhrchen; Pipetten 4, 2, 0,100, 0,050 und 0,020 ml; Standard-Kunststoffküvetten.

Notwendige Reagenzien:

1. Triäthanolamin-hydrochlorid
2. Kaliumcarbonat, p.a.
3. Natriumhydrogencarbonat, 5 % (w/v)
4. Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, p.a.
5. Perchlorsäure, p.a., 70 % (w/w), Dichte = 1,67
6. Phosphoenolpyruvat, PEP (Tricyclohexylammoniumsalz)
7. Adenosintriphosphat, ATP (Dinatriumsalz $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
8. Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid, NADH (Dinatriumsalz NADH-Na_2)
9. Creatin-Kinase, CK, aus Kaninchen-Skelettmuskel, lyophilisiert; $\geq 25 \text{ U/mg}$ (25°C)

10. Lactat-Dehydrogenase, LDH, aus Kaninchen-Skelettmuskel kristallisiert, Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung; ≥ 550 U/mg (25°C)
11. Pyruvat-Kinase, PK, aus Kaninchen-Skelettmuskel kristallisiert, Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung; ≥ 200 U/mg (25°C)
12. Glycin, p.a.
13. Ammoniumsulfat, p.a.
14. frisches destilliertes Wasser

Herstellung der Lösungen:

- I. Triäthanolamin / K_2CO_3 (0,21 M Triäthanolamin; 1,16 M K_2CO_3): 1,0 g Triäthanolamin-hydrochlorid und 4,0 g K_2CO_3 mit Wasser ad 25 ml lösen.
(Unbegrenzt haltbar bei $+4^{\circ}\text{C}$; für 25 Best.)
- II. Phosphoenolpyruvat / Magnesiumchlorid (10 mM PEP; 0,4 M MgCl_2): 1,4 mg PEP und 250 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ mit 3 ml H_2O lösen.
(1 Woche haltbar bei $+4^{\circ}\text{C}$; für 20 Best.)
- III. Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid / Adenosintriphosphat (5 mM $\beta\text{-NADH-Na}_2$, 25 mM ATP): 16 mg NADH-Na_2 und 30 mg $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ in 2 ml 5 %-iger NaHCO_3 -Lösung lösen.
(1 Woche bei $+4^{\circ}\text{C}$ haltbar; für 20 Best.)
- IV. Lactat-Dehydrogenase / Pyruvat-Kinase, LDH / PK (je 1 mg Protein/ml): Stammsuspension mit 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung entsprechend verdünnen und mischen.
(~ 1 Jahr bei $+4^{\circ}\text{C}$ haltbar)
- V. Creatin-Kinase, CK (120 mg Protein/ml): 60 mg Enzymprotein mit 0,5 %iger NaHCO_3 -Lösung lösen; gegebenenfalls Trübung durch Zentrifugation entfernen.
(Lösung täglich frisch ansetzen; für 25 Best.)
- VI. Perchlorsäure (0,6 N): 5,2 ml 70 %ige Perchlorsäure mit Wasser ad 100 ml verdünnen.
(unbegrenzt bei $+4^{\circ}\text{C}$ haltbar)

Testbedingungen in der Küvette 2,32 ml

STOFF	μmol	mmol/l
Kreatin bis	0,348	0,150
Triäthanolamin-hydrochlorid	107,730	46,435
K_2CO_3	578,829	249,495
NaHCO_3	60,707	26,167
MgCl_2	61,482	26,501
PEP	1,504	0,648
ATP	2,479	1,069
NADH	1,073	0,453 ⁺
LDH 550 U/mg	27,500 U	11853,448 U/l
PK 200 U/mg	10,000 U	4310,345 U/l
CK 25 U/mg	60,000 U	25862,069 U/l

Tab. 3.06

⁺ Hier ergibt sich ein Widerspruch bei den Angaben von BERNT, BERGMAYER und MÖLLERING. Als Konzentration im Test geben die Autoren für NADH 0,2 mmol/l an. Die hier aufgeführte NADH-Konzentration berechnet sich aus der Einwaage für $\text{NADH} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, die der Vorschrift zur Herstellung der Lösungen entspricht.

Durchführung des Tests:

In einem Zentrifugenglas werden 4 ml Serum (oder Plasma) mit 4 ml eiskalter Perchlorsäure-Lösung (VI) enteiweißt und 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Vom Überstand werden 3 ml mit 1 ml Triäthanolamin / K_2CO_3 -Lösung (I) versetzt und vom Perchloratniederschlag nach 15 min Stehen in Eis abfiltriert. Das auf pH = 8 - 9 gepufferte Filtrat wird nun auf ca. 25°C temperiert. Von dem Filtrat werden 2 ml in eine Einmalküvette pipettiert und 0,150 ml PEP / $MgCl_2$ -Lösung (II), 0,100 ml NADH / ATP-Lösung (III), sowie 0,050 ml LDH / PK-Suspension hinzugemischt. Die photometrische Messung erfolgt gegen Luft. Die anfängliche Extinktionsänderung wird bis zur Konstanz nach 10 - 15 min verfolgt - oder wie bei den hier durchgeführten Versuchen mit einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet. Die Extinktion E_1 wird abgelesen und dann sofort 0,020 ml CK-Lösung (V) eingemischt. Nach 15, 20 und 35 min werden die Extinktionen abgelesen und durch Extrapolation dieser Werte auf den Zeitpunkt der CK-Zugabe die Extinktion E_2 bestimmt. Der durch die Zugabe der CK-Lösung (V) aufgetretene Extinktionssprung wird am Ende der Reaktion durch erneutes Einpipettieren von 0,020 ml CK-Lösung ermittelt. Er muß von ΔE abgezogen werden, wobei $\Delta E = E_1 - E_2$.

Berechnung:

Meßstrahlung:	334 nm	365 nm	
c =	$\Delta E \cdot 6,562$	$\Delta E \cdot 11,789$	(mg/100 ml)
c =	$\Delta E \cdot 0,501$	$\Delta E \cdot 0,899$	(mmol/l)
F =	$\frac{4 + 4}{4}$	$\cdot \frac{3 + 1}{3}$	

Enteiweißung Neutralisation

Eigene Versuche:

Es war möglich den gesamten Ansatz zu halbieren und dadurch den Serumbedarf auf 2 ml zu reduzieren. Die Proben wurden einzeln allen Bearbeitungsschritten unterzogen. Insgesamt erfolgte die Serienuntersuchung mit 10 Pool-Seren und 30 aufgestockten Pool-Seren. Die bei 365 nm

gemessenen Extinktionsänderungen wurden mit dem Kompensationsschreiber aufgezeichnet. Die zweite Zugabe der CK-Lösung zur Auffindung des Extinktionssprungs konnte deshalb unterbleiben. Bei der Durchführung des Tests erwies sich das Abfiltrieren der neutralisierten Lösungen in Eis als arbeitsintensiv und zeitraubend. Eine größere Serie zur gleichen Zeit zu verarbeiten war deshalb kaum möglich. Bei der Prüfung von Präzision und Richtigkeit wurden gute Resultate erzielt. Die Ergebnisse der Serienuntersuchung sind der Tabelle 3.07 zu entnehmen.

Serienuntersuchung: Kreatin im Serum

Kreatin	Pool	Pool + 0,5		Pool + 1,0		Pool + 2,0	
	mg/100ml	mg/100ml	Diff.	mg/100ml	Diff.	mg/100ml	Diff.
I	0,64	1,16	0,52	1,63	0,99	2,61	1,97
II	0,59	1,11	0,52	1,64	1,05	2,76	2,17
III	0,66	1,17	0,51	1,63	0,97	2,61	1,95
IV	0,65	1,13	0,48	1,65	1,00	2,65	2,00
V	0,65	1,12	0,47	1,66	1,01	2,64	1,99
VI	0,62	1,08	0,46	1,65	1,03	2,65	2,03
VII	0,61	1,13	0,52	1,64	1,03	2,59	1,98
VIII	0,62	1,14	0,52	1,65	1,03	2,60	1,98
IX	0,64	1,16	0,52	1,60	0,96	2,65	2,01
X	0,60	1,11	0,51	1,66	1,06	2,60	2,00

n = 10

$\bar{x}$	0,63	1,13	0,50	1,64	1,01	2,64	2,01
s	0,023	0,028	0,024	0,018	0,033	0,049	0,061
VK %	3,65	2,48		1,10		1,86	
Wieder-			0,50		1,01		2,01
findung			100,0 %		101,0 %		100,5 %
R %			± 0		+ 1,0		+ 0,5
+ 3s	0,70	1,21		1,69		2,79	
- 3s	0,56	1,05		1,59		2,49	

Tab. 3.07

3.2.5. Eine neue einfache Methode zur enzymatischen Kreatininbestimmung (Halbmikromethode)

In mehreren größeren Versuchsreihen wurde die Anwendbarkeit der bereits beschriebenen Methoden zur enzymatischen Kreatininbestimmung im Routinebetrieb getestet. Es zeigte sich dabei, daß sie im Vergleich zu anderen enzymatischen Substratbestimmungen, die in Form von konfektionierten Testansätzen bereits von der Industrie angeboten werden (für Ammoniak, Lactat, Pyruvat etc.), viel zu aufwendig sind. Auf Grund der gemachten Erfahrungen wurde deshalb versucht, ein einfaches, aber spezifisches Testverfahren zu entwickeln, das sich gleichermaßen für klinisch-chemische und humanbiologische Untersuchungen eignet. Die neue Methode sollte daher folgende Forderungen erfüllen: 1. hohe Spezifität, 2. geringer Serumbedarf (Kinder!), 3. mäßiger apparativer und personeller Aufwand sowie 4. einfache und schnelle Durchführbarkeit. Die ursprüngliche Idee einer kinetischen Methode zur enzymatischen Kreatininbestimmung konnte nicht verwirklicht werden. Sie hätte zur Erlangung verlässlicher Ergebnisse so hohe Anforderungen an die Testbedingungen gestellt (hohes Auflösungsvermögen des Meßgeräts und Temperaturkonstanz), wie sie nur mit Analysenautomaten oder Fast Analyzern erreicht werden. Da die benötigten Reagenzien-Lösungen vom Untersucher selbst herzustellen sind, hätten geringe Abweichungen von der Vorschrift (Wägefehler etc.) zusätzliche Probleme ergeben. Auch wäre das Erstellen von Eichkurven für jede neue Meßreihe sowie ein striktes Einhalten der Versuchsbedingungen notwendig gewesen (s. hierzu BERGMAYER 1977). Hingegen ist eine enzymatische Endwert-Methode gegenüber geringen Abweichungen von den vorgeschriebenen Testbedingungen relativ unempfindlich; ihr wurde deshalb der Vorzug gegeben.

Bei dem hier vorgeschlagenen neuen Test konnte das Serumvolumen mit 0,250 ml im Vergleich zu den üblichen Analysenvorschriften recht gering gehalten werden. Eine weitere Reduzierung wurde aber einerseits durch den niedrigen Serum-Kreatin Spiegel und andererseits durch das verwendete Meßsystem unmöglich gemacht. So konnte mit dem benutzten Spek-

trallinien-Photometer (Eppendorf 1101) nur bei 365 nm gearbeitet werden. Für die Benutzung der wesentlich günstigeren Wellenlänge $\lambda = 334$ nm erwies sich der Meßverstärker als zu schwach, und die erhaltenen Kurvenaufzeichnungen wurden unruhig. Da die Wellenlänge $\lambda = 334$ nm näher am Maximum der Absorptionskurve von NADH liegt als die Linien um 365 nm, kann die Empfindlichkeit des Tests durch Verwendung eines 334 nm-Filters weiter gesteigert werden. Mit entsprechenden Photometern ist dies leicht möglich. Alle Berechnungsformeln werden deshalb auch für $\lambda = 334$ nm angegeben. Prinzipiell läßt sich die Kreatinbestimmung auch ohne Kompensationsschreiber durchführen. Auf eine Analogregistrierung sollte aber bei der Erprobung des Tests nicht verzichtet werden, da sie eine direkte Überwachung des Reaktionsablaufs gestattet und das Auffinden von Störungen erheblich erleichtert.

3.2.5.1. Kreatin-Standard-Lösungen

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen zur enzymatischen Kreatinbestimmung mußten reine Kreatin-Standard-Lösungen hergestellt werden. Ein primärer Standard ist nicht im Handel (Grade C: Primary standard. A commercially available substance of purity $100 \pm 0,02\%$ ¹). Zur Bereitung eines "klinischen Standards" wurden deshalb von der Firma Carl ROTH (Karlsruhe) 99 % reines Creatin, wasserfrei, puriss. CHR (zwei verschiedene Chargen) und von der Firma MERCK (Darmstadt) Kreatin (Monohydrat), reinst. (Gehalt 99 %) bezogen. Von den 3 Substanzen wurden definierte Massen in verschließbare Wägegläschen eingewogen. Eine Serie wurde bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C im Trockenschrank belassen, die andere Serie wurde im evakuierten Exsikkator über Silicagel bei Raumtemperatur getrocknet. Da die hitzegetrockneten Proben eine leichte Verfärbung aufwiesen, kamen für die weiteren Versuche nur die bei Raumtemperatur getrockneten gewichtskonstanten Kreatin-Proben zur Verwendung.

1 International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)

Trocknungsverluste (Gewichtskonstanz, Exsikkator)

I	Kreatin, wasserfrei (ROTH, A)	11,96 %
II	Kreatin, wasserfrei (ROTH, B)	6,30 %
III	Kreatin, Monohydrat (MERCK)	12,01 %

Die Firma MERCK gibt den Trocknungsverlust bei 105 °C für ihr Monohydrat mit 11,8-12,4 % an. Der theoretisch vorhandene Anteil Wasser im Kreatin-Monohydrat (Mol.-Gew. 149,15) beträgt 12,07 % (w/w). Es herrscht also eine gute Übereinstimmung mit den durch die Wägungen ermittelten Werten.

Die getrockneten Proben wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf Reinheit geprüft ¹. Von den 3 Proben, sowie einer Kreatinin-Kontrolle (MERCK 5208) wurden wässrige Lösungen mit einer Massenkonzentration von 100 mg/100 ml angesetzt, jeweils doppelt aufgetragen und für 2 Stunden getrennt. Die entwickelten Platten wurden im Trockenschrank 2 Stunden bei 130 °C getrocknet, wobei gleichzeitig eine Umwandlung von Kreatin in Kreatinin stattfand. Die anschließende Färbung erfolgte durch Besprühen mit Pikrinsäure (10 min Trockenschrank 130 °C) und Natronlauge. Diese Reagenzien ergeben mit Kreatinin die charakteristische gelb- bis orange-rote Färbung (s. 3.1.1.).

<u>R_f-Werte</u>	<u>R_f</u>	
I	Kreatin, wasserfrei (ROTH, A)	0,365 breites Tailing
II	Kreatin, wasserfrei (ROTH, B)	0,364
III	Kreatin, Monohydrat (MERCK)	0,351
IV	Kreatinin (MERCK)	0,401

Der Kreatiningehalt der Proben (100 mg Kreatin/100 ml) wurde auch mit dem TECHNICON AutoAnalyzer (Jaffé-Methode) überprüft.

1 DC-Platte: MERCK, Kieselgel 60 F 254, 0,25 mm; Laufmittelgemisch: 105 ml n-Propanol, 105 ml Methanol, 20 ml H₂O dest.

<u>Kreatin 100 mg/100 ml</u>	<u>Kreatinin mg/100 ml</u>
I Kreatin, wasserfrei (ROTH, A)	1,5
II Kreatin, wasserfrei (ROTH, B)	0,2
III Kreatin, Monohydrat (MERCK)	0,2

Für die weiteren Versuche wurde nur noch das bei 20°C im evakuierten Exsikkator getrocknete Kreatin III (Monohydrat, MERCK) verwendet. Es wies die geringsten Verunreinigungen auf und enthielt einen meßbaren Anteil von nur 0,2 % (w/w) Kreatinin. Zum Ausgleich von Wägefehlern wurden in 3 geeichte 20 ml-Meßkölbchen jeweils 80 mg Kreatin eingewogen und wäßrige Lösungen hergestellt, die später vereinigt wurden. Diese Kreatin-Standard-Lösung enthielt 400 mg Kreatin/100 ml. Aus ihr wurden Verdünnungsreihen hergestellt: 40, 30, 20, 10, 5, 2 und 1 mg/100 ml. Alle wäßrigen Kreatin-Lösungen waren bei Lagerung im Gefrierschrank mindestens 2 Jahre haltbar.

3.2.5.2. Seren zur Präzisions- und Richtigkeitskontrolle

Für die enzymatische Kreatininbestimmung muß, wie für jedes andere Analysenverfahren in medizinischen Laboratorien, eine statistische Qualitätskontrolle durchgeführt werden. Diese besteht üblicherweise aus einer Kontrolle von Präzision und Richtigkeit.

Die Präzision der Kreatininbestimmung im Serum wurde mit verschiedenen gepoolten Seren kontrolliert. Hergestellt wurden diese nur aus Probanden-Seren, die keine pathologischen Werte bei den unter 4.1.2.1. und 4.1.2.2. beschriebenen klinisch-chemischen Untersuchungen ergaben. Die Lagerung des sorgfältig gemischten und zentrifugierten Pool-Serums erfolgte im Gefrierschrank. Ein Teil des so gewonnenen Pool-Serums wurde -zur Korrektur auf aufgestocktes Serum- mit 1,0 % (v/v) destilliertem Wasser verdünnt und dann gebrauchsfertig in kleinen Portionen (1ml) eingefroren.

Da es keine Kontroll-Seren für die Kreatininbestimmung zu kaufen gibt, muß man Richtigkeitskontrollen selbst her-

stellen. Hierzu wurde in 100 ml-Meßkölbchen blasenfrei Pool-Serum eingebracht, mit 1,000 ml verdünnter wäßriger Kreatin-Standard-Lösung versetzt und bis zur Eichmarke mit Pool-Serum aufgefüllt. Nach sorgfältigem Mischen konnten die aufgestockten Pool-Seren in Eppendorf Reaktionsgefäßen abgefüllt und eingefroren werden. Es gab 2 Serien mit verschiedenen Pool-Seren.

A: Pool ; Pool + 0,5 mg Kreatin/100 ml ; Pool + 1,0 mg Kreatin/100 ml ; Pool + 2,0 mg Kreatin/100 ml

B: Pool ; Pool + 2,0 mg Kreatin/100 ml ; Pool + 4,0 mg Kreatin/100 ml

Eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle der Richtigkeit erhält man durch die Zugabe von 0,020 ml wäßriger verdünnter Kreatin-Standard-Lösung zu Serum vor der Enteiweißung. Die Enteiweißung ist dann mit nur 0,230 ml H₂O und 0,250 ml Uranylacetat-Lösung 1,6% durchzuführen. Auf diese Weise wurden auch die Angaben über die Linearität der Kreatinbestimmung gewonnen.

Ein weit einfacheres, aber nur bei geringerem Verbrauch (max. 10 ml aufgestocktes Serum) empfehlenswertes Verfahren zur Herstellung von Richtigkeitskontrollen wird unter 3.2.5.8. "Herstellung der Lösungen, VII" beschrieben.

Bei der Kreatinbestimmung erfolgte die Präzisions- und Richtigkeitskontrolle mindestens einmal in jeder Serie. Die Pool-Seren sind bei der Aufbewahrung im Gefrierschrank etwa 2 bis 3 Jahre haltbar.

3.2.5.3. Enteiweißung von Serum

Wie bei vielen anderen Metabolitbestimmungen ist auch bei der Kreatinbestimmung eine Enteiweißung des Serums notwendig. Oftmals können Trübungen, Präzipitationen oder die Farbe der Probe die direkte Messung stören (BERGMEYER 1977). Es wurden deshalb verschiedene Enteiweißungsmittel, wie Trichloressigsäure, Perchlorsäure, Äthylalkohol, NELSON-SOMOGYI-Reagenzien, URAC^R und Uranylacetat 0,8%, eingehend getestet. Erstaunlicherweise führte gerade die Enteiweißung

mit 0,8%-iger Uranylacetat-Lösung bezüglich Handhabung und Richtigkeit zu den besten Ergebnissen, obwohl nach HALLMANN (1966) Kreatin und Kreatinin teilweise mitgefällt werden sollen. Eigene Versuche mit einer Vielzahl aufgestockter Seren ergaben aber keine Kreatinverluste durch die Enteiweißung mit Uranylacetat. Aufgrund der geringen Kreatinkonzentration von Serum ist das Verdünnungsverhältnis von nur 1:3 meßtechnisch besonders günstig. Die Enteiweißung erfolgt durch Zugabe von 0,500 ml kalter Uranylacetat-Lösung zu 0,250 ml Serum in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (3810). Das verschlossene Reaktionsgefäß läßt man für 30 Sekunden auf dem Rotationsmischer rütteln oder schüttelt es mehrmals kräftig von Hand. Anschließend wird in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Man erhält einen gelbweißen Niederschlag, der relativ fest in der Gefäßspitze haftet. Vom klaren Überstand können jetzt 0,500 ml für den Test entnommen werden. Für alle Pipettievorgänge werden nur Kolbenhubpipetten benutzt, da Uranylacetat-Lösung giftig und in geringem Maße radioaktiv ist. Trotz dieser Nachteile sind Uransalz-Lösungen in der klinischen Chemie wichtige kationische Fällungsmittel (andere Enteiweißungsmittel sind leider ebenfalls toxisch oder ätzend). Die Verwendung von Uranylacetat in isotonischer Lösung soll zudem den Vorteil besitzen, daß bei geeigneter Konzentration das Fällungsmittel fast quantitativ an das Präzipitat gebunden wird. Eine nachträgliche Entfernung der Kationen kann dann entfallen (BERGMEYER 1977). Es wurden diesbezüglich eigene Untersuchungen durchgeführt. Mit Uranylacetat/Wasser-Gemisch können Seren mit einem Gesamteiweiß zwischen 6,0 und 12,0 g/100 ml enteiweißt werden. Bei Verwendung eines Uranylacetat/Kochsalz-Gemischs liegt dieser Bereich zwischen 4,0 und 12,0 g/100 ml. In der Praxis wurden die Grenzen aber nur einmal unterschritten (Kleinkind mit Nephrotischem Syndrom; Gesamteiweiß < 3 g/100 ml). Der wäßrige Überstand blieb nach der Enteiweißung mit Uranylacetat/Wasser-Gemisch gelb gefärbt. Eine einwandfreie Fällung ließ sich in diesem Fall durch 1:1 mit Wasser verdünntem Enteiweißungsmittel erreichen.

Da die Reaktionsgeschwindigkeit des Testsystems bei Enteiweißung mit Uranylacetat/ H_2O etwas größer ist als mit Uranylacetat/ $NaCl$, wurde zur Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen ein Uranylacetat/ H_2O -Gemisch benutzt. Wie aus Tab. 3.08 ersichtlich, führen beide Varianten aber zu identischen Ergebnissen. Der enteiweißte Überstand ist im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar.

Bei der Berechnung der Kreatinkonzentration im Serum wird der Volumenverdrängungseffekt nicht berücksichtigt. Wiederfindungsversuche zeigten keine Unterschiede bei Proben mit einem Gesamteiweiß zwischen 4,0 und 10,0 g/100 ml.

Der entscheidende Vorteil der Enteiweißung mit Uranylacetat-Lösung für die Kreatinbestimmung liegt in der Tatsache, daß bereits nach 5 minütigem Zentrifugieren ein klarer Überstand gewonnen wird. Dieser kann direkt in den Test eingesetzt werden. Eine Adsorption von Kreatin an das Präzipitat wird nicht beobachtet. Arbeitsintensive Behandlungen der Proben wie Filtration, Neutralisation oder Ausschütteln entfallen. Das Verfahren ist deshalb auch bei größeren Serien, wie sie bei klinischen und humanbiologischen Untersuchungen vorkommen, anwendbar.

Vergleich der Enteiweißungsmittel bei 12 verschiedenen Seren

Probe	Uranylacetat/H ₂ C	Uranylacetat/NaCl
	Kreatin mg/100 ml	Kreatin mg/100 ml
1	0,20	0,20
2	0,23	0,23
3	0,25	0,25
4	0,27	0,27
5	0,63	0,63
6	0,70	0,70
7	0,81	0,79
8	0,87	0,85
9	1,14	1,14
10	2,67	2,67
11	2,71	2,73
12	4,70	4,70
pH des eiweiß- freien Überstands	5,20	5,30
pH nach Pufferung mit Reagenzien-Mix	8,15	8,15
pH nach Pufferung mit Reagenzien-Mix und NADH/PK/LDH-Lsg.	8,21	8,20
pH nach Reaktions- ablauf	8,20	8,20

Tab. 3.08

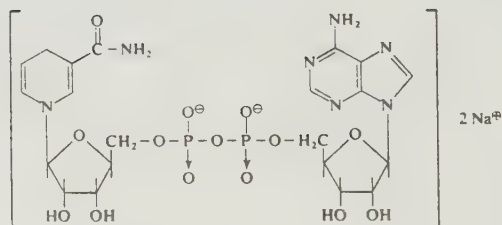
3.2.5.4. Optimale Reaktionsbedingungen

Die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen erfolgte schrittweise. Erst wurden Pool-Seren und aufgestockte Poolseren entsprechend der Anleitung von KIBRICK und MILHORAT (1965) mit Hilfe der NELSON-SOMOGYI-Reagenzien enteiweißt und für dieses eiweißfreie Filtrat das optimale Reagenzien-gemisch bestimmt. Mit diesen Reagenzien erfolgte die Testung der verschiedenen Enteiweißungsmittel mit Überprüfung der Wiederfindung von zugesetztem Kreatin. Wie schon beschrieben, ergab die Verwendung von Uranylacetat-Lösung die besten Ergebnisse. Die einzelnen Pipettierschritte wurden nun aufeinander abgestimmt und die technisch günstigsten Volumina für Serum, Enteiweißungsmittel, wäßrigen Überstand, Reagenzien-Mix und Enzymsuspensionen festgelegt. Danach erfolgte die nochmalige Überprüfung der Testbedingungen. Verwendet wurde hierzu der wäßrige Überstand eines frischen Pool-Serums, das aufgestockt 6,26 mg Kreatin/100 ml Serum enthielt. Die im folgenden angegebenen Meßbedingungen wurden jeweils in 10 Stufen verändert, wobei alle übrigen Bedingungen der Vorschrift entsprachen. Nur die Konzentration von NADH mußte von vornherein so gewählt werden, daß eine gut meßbare Ausgangsextinktion resultierte. Es galt einen Kompromiß zwischen einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Konzentrationserhöhung des Cosubstrats und einer technisch noch beherrschbaren Ausgangsextinktion zu finden. Die im Test erreichte theoretische NADH-Extinktion beträgt 1.775 bei einer Wellenlänge von 365 nm.

Die Auswertung der kontinuierlich aufgezeichneten Reaktionskurven erfolgte auf zwei Arten, deren Ergebnisse aus den Abb. 3.03 bis 3.10 zu ersehen sind. Einmal wurde die Abnahme der Extinktion pro Zeiteinheit (hier $\Delta E_{365}/\text{min}$) gemessen. Da teilweise Anlaufphasen bzw. gekrümmte Umsatzkurven beobachtet wurden, erfolgte die Messung mit "fliegendem Start" nach BÜCHER (aus BERGMAYER 1977). Bei dieser Methode wird nach einer anfänglichen NADH-Extinktionsänderung von 0.030 die Zeit für eine weitere Extinktionsabnahme von 0.100 gemessen und aus den erhaltenen Werten die Reak-

tionsgeschwindigkeit berechnet. Allerdings erhält man hier nicht die Maximalwerte (v_i). Bei der zweiten Art der Auswertung wurde der nach 1,5 Minuten erfolgte Kreatinumsatz in Prozent des insgesamt im Ansatz vorhandenen Kreatins ausgedrückt. Zusätzlich ergaben sich noch andere Möglichkeiten der Auswertung (Anlaufzeiten von 0, 6, 12 und 18 s, sowie Reaktionszeiten von 30, 60, 90 und 120 s), sie führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

Alle Angaben in den folgenden Kurven werden in mmol/l Küvetteninhalt bzw. U/l Küvetteninhalt gemacht. Während der Messungen wurde auf eine strikte Einhaltung der Temperatur von 25 °C in den Küvetten geachtet (Thermostat-Kontrolle). Dies ist von großer Bedeutung, da der Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit bei enzym-katalysierten Reaktionen 10% pro Grad C und mehr betragen kann (BERGMAYER 1974).



β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid Dinatriumsalz, reduziert
 β -NADH- Na_2
 (Diphosphopyridinnucleotid red. Dinatriumsalz, DPNH_2)
 (aus MERCK, Präparate für die Biochemie)

A: pH-Wert

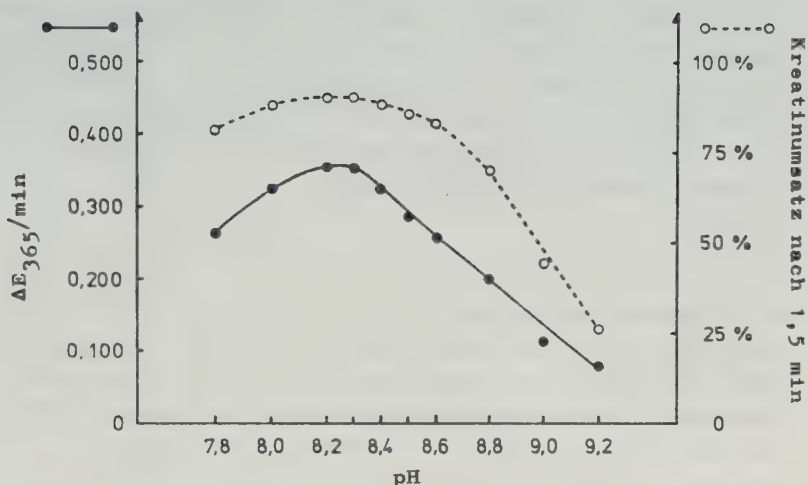


Abb. 3.03

Die Extinktionsänderung pro Minute und der Kreatinumsatz nach 1,5 Minuten in Abhängigkeit vom pH in Glycylglycin-Puffer, 125 mmol/l. Alle anderen Bedingungen entsprechen dem vorgeschlagenen Analysenansatz.

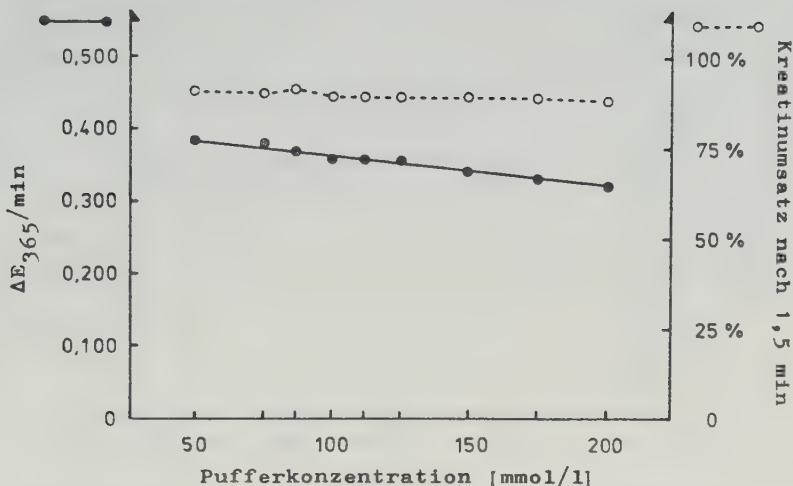
Die verschiedenen pH-Werte des Küvetteninhalts wurden unter Zuhilfenahme eines pH-Meters mit 1 mol/l NaOH-Lsg. eingestellt, wobei Volumen und Konzentrationen im Test konstant blieben. Für Glycylglycin-Puffer, 125 mmol/l, ergibt sich bei Auswertung nach BÜCHER ein relativ schmales pH-Optimum zwischen $\text{pH} = 8,2$ und $\text{pH} = 8,3$. Bei Berücksichtigung des Kreatinumsatzes nach 1,5 min ist es bei gleicher Lage etwas breiter. Im vorgeschlagenen Test wird deshalb eine Einstellung der Reagenzien-Mix/Puffer-Lösung und der Glycylglycin-Puffer auf $\text{pH} = 8,3$ empfohlen.

Neben Glycylglycin ($\text{pK}_2 = 8,26$ [■]) wurden auch Glycin ($\text{pK}_2 = 9,78$) und TRICIN ¹ ($\text{pK} = 8,05$) für die Kreatinbestimmung erprobt. Glycylglycin ist am geeignetsten, da hier das pH-Optimum der Reaktion und der pK -Wert des Puffers zusammen-

¹ TRICIN = N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin

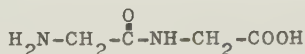
fallen. Die Pufferkapazität ist nämlich beim pH der Halbneutralisation am größten (NETTER 1959). Glycin wird zwar von anderen Untersuchern benutzt, jedoch ist seine Pufferkapazität geringer als die von Glycylglycin (FROMAGEOT et WATREMEZ 1930). Mit TRICIN ergab sich ein wesentlich stärkerer "Schleich" (inkonstanter Endwert) bei insgesamt geringerer Reaktionsgeschwindigkeit.

* Die angegebenen pK-Werte gelten für 25°C. Die Firma MERCK gibt für Glycylglycin den pK_2 mit 8,13 an, GREENSTEIN (1933) berichtet von einem scheinbaren Dissoziationsexponenten $pK_2' = 8,17$. Der mit Hilfe einer Titrationskurve selbst ermittelte Wert von $pK_2 = 8,25$ deckt sich am besten mit den Angaben von GOOD et al. (1966) $pK_2 = 8,26$.

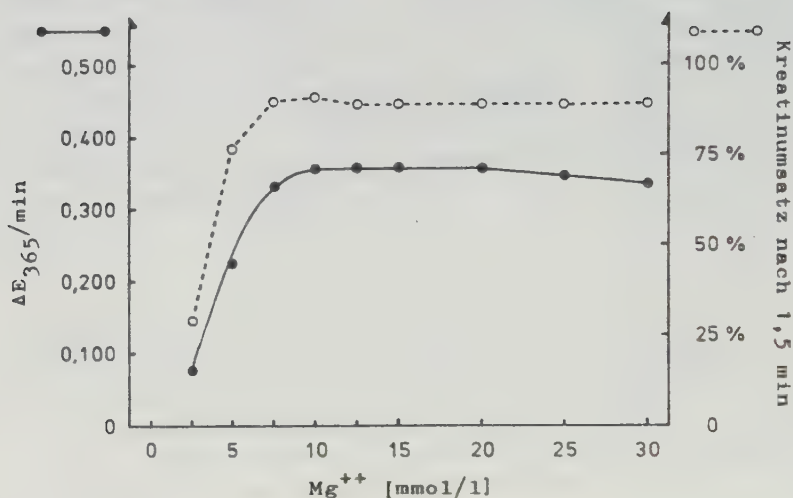
B: GlycylglycinAbb. 3.04

Die Extinktionsänderung pro Minute und der Kreatinumsatz nach 1,5 Minuten in Abhängigkeit von der Konzentration des Glycylglycin-Puffer, pH 8,3. Alle anderen Bedingungen entsprechen dem vorgeschlagenen Analysenansatz.

Glycylglycin ([Aminoacetyl-amino]-essigsäure) ist das einfachste aller Peptide und stellt nach Angaben von COLWICK und KAPLAN (1972) einen excellenten Puffer für biologische Systeme in diesem pH-Bereich dar. Seine Bindung von Mg^{++} -Ionen ist vernachlässigbar gering. Die Löslichkeit in Wasser beträgt bei 25 °C 1,77 mol/l (SMITH and SMITH 1942). Mit steigender Pufferkonzentration nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Nach 1,5 min sind aber die Kreatinumsätze bei Konzentrationen zwischen 50 und 200 mmol/l nahezu gleich. Zur Konstanthaltung des pH-Wertes in der Küvette wird eine Stoffmengenkonzentration von 125 mmol/l benötigt.



Glycylglycin

C: MagnesiumacetatAbb. 3.05

Die Extinktionsänderung pro Minute und der Kreatinumsatz nach 1,5 Minuten in Abhängigkeit von der Konzentration von Magnesiumacetat. Alle anderen Bedingungen entsprechen dem vorgeschlagenen Analysenansatz.

Die Enzyme Creatin-Kinase und Pyruvat-Kinase benötigen zur Ausbildung voller Aktivität die Anwesenheit von Magnesium-Ionen. Versuche zeigten für Magnesiumchlorid und Magnesiumacetat denselben Effekt. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ist stark hygroskopisch, dies erschwert das korrekte Einwiegen. Im Test wird deshalb $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ benutzt; es ist leichter zu handhaben. Die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten werden bei einer Magnesiumacetatkonzentration zwischen 10 und 20 mmol/l erreicht, empfohlen werden 10 mmol/l. Sind keine Mg^{++} -Ionen im Ansatz vorhanden, ergibt sich nach Start der Reaktion mit CK eine langsame Extinktionsänderung, die aber nicht zu meßbaren Ergebnissen führt.

D: Adenosin-5'-triphosphat

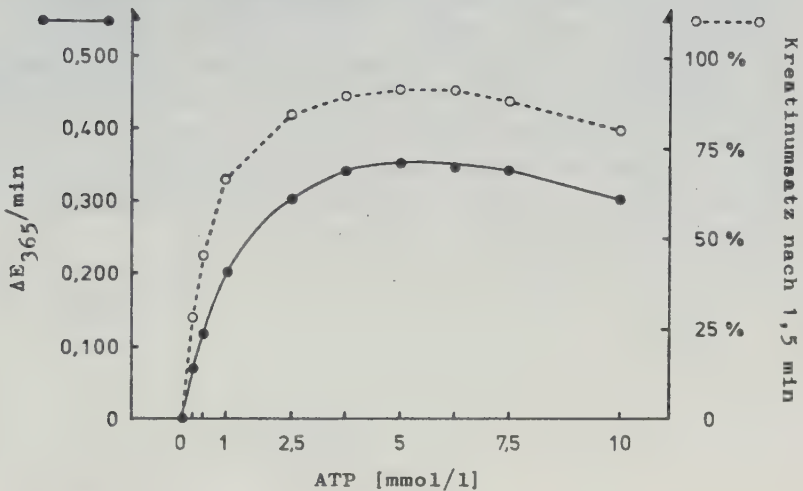


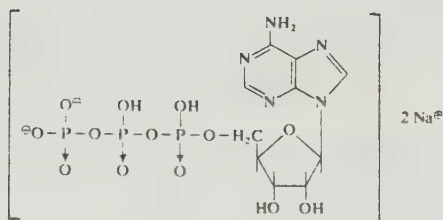
Abb. 3.06

Die Extinktionsänderung pro Minute und der Kreatinumsatz nach 1,5 Minuten in Abhängigkeit von der Konzentration von Adenosin-5'-triphosphat. Alle anderen Bedingungen entsprechen dem vorgeschlagenen Analysenansatz.

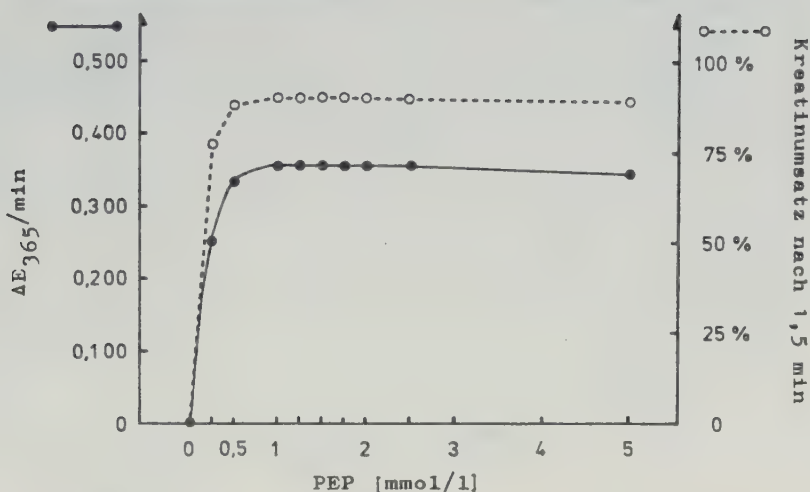
Zum Erreichen einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit wird Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in einer Stoffmengenkonzentration von 5 mmol/l im Test benötigt; bei höheren Konzentrationen tritt eine Hemmung auf. ATP hat ein Stabilitätsoptimum in Lösung bei pH ca. 9. ADP, das während des Reaktionsablaufs aus ATP gebildet wird, vermag die CK ebenfalls zu hemmen (nicht kompetitiv Kreatin bzw. kompetitiv ATP). Durch den zweiten Reaktionsschritt (PK) wird ADP aber wieder zu ATP umgesetzt (ATP/ADP-Zyklus). Durch diese "ATP-regenerierende Reaktion" wird die Konzentration von ATP in der Küvette während der Messung konstant gehalten. Somit verhält sich die Primär-Reaktion näherungsweise wie eine Ein-Substrat-Reaktion (BERGMEYER 1974 und 1977).

Vom Hersteller (BOEHRINGER MANNHEIM 1978) wird für ATP ein

enzymatisch ermittelter Gehalt von 0,5% ADP + A-5-MP angegeben, wobei der ATP-Gehalt innerhalb von 12 Monaten um ca. 3% abnehmen kann. Eigene Untersuchungen bestätigten die Anwesenheit von bis zu 0,8% (w/w) ADP im Meßsystem, bezogen auf die Einwaage von ATP. Vor der CK-Reaktion kann daher durch ADP eine initiale Extinktionsabnahme von etwa $\Delta E_{365} = 0.200$ verursacht werden. Es sollten daher keine zu alten ATP-Chargen zur Kreatinbestimmung verwendet werden; auf das Verfallsdatum ist zu achten.



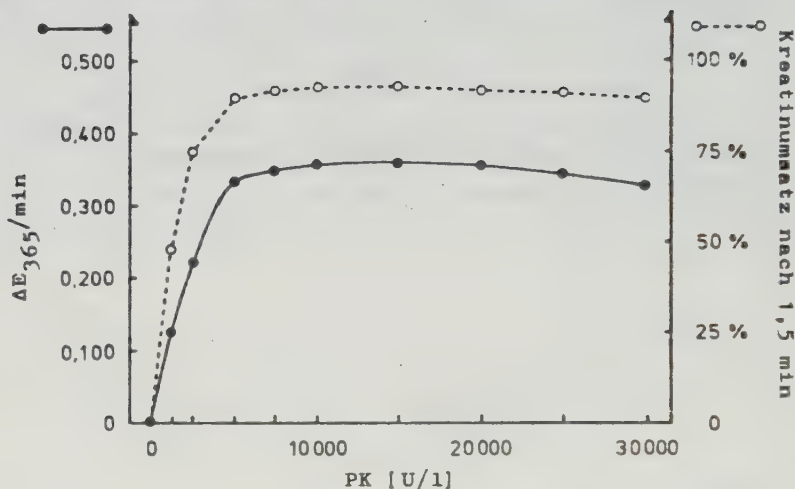
Adenosin-5'-triphosphorsäure Dinatriumsalz (ATP-Na₂H₂)
(aus MERCK, Präparate für die Biochemie)

E: PhosphoenolpyruvatAbb. 3.07

Die Extinktionsänderung pro Minute und der Kreatinumsatz nach 1,5 Minuten in Abhängigkeit von der Konzentration von Phosphoenolpyruvat. Alle anderen Bedingungen entsprechen dem vorgeschlagenen Analysenansatz.

Für Phosphoenolpyruvat ergibt sich ein relativ weiter Bereich maximaler Reaktionsgeschwindigkeit für Stoffmengenkonzentrationen zwischen 1,0 und 2,5 mmol/l. Erst bei 5,0 mmol/l beobachtet man eine leichte Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Die vorgeschlagene Testkonzentration für PEP ist 1,5 mmol/l.

Phosphoenolpyruvat (kristallisiertes Tricyclohexylammoniumsalz) kann Pyruvat enthalten, das -vor der eigentlichen Meßreaktion zur Kreatinbestimmung- unter NADH-Verbrauch zu Lactat umgesetzt wird.

F: Pyruvat-KinaseAbb. 3.08

Die Extinktionsänderung pro Minute und der Kreatinumsatz nach 1,5 Minuten in Abhängigkeit von der Pyruvat-Kinase-Aktivität. Alle anderen Bedingungen entsprechen dem vorgeschlagenen Analysenansatz.

Bei einer Volumenaktivität der Pyruvat-Kinase von 10 000 U/l wird erstmals maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Technisch einfach ist die Verwendung von 10 127 U/l im Testansatz (3.2.5.8. V). Eine weitere Erhöhung der Enzymaktivität führt nur zu einer Steigerung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit v_i , hat aber keine Auswirkungen auf den Kreatinumsatz nach 1,5 min. Bei höheren PK-Aktivitäten verstreicht der Startpunkt E_i der Reaktionskurve, so daß sich Schwierigkeiten bei der graphischen Auswertung ergeben. Neben Mg^{++} -Ionen benötigt die Pyruvat-Kinase zur Aktivierung noch $(NH_4)^+$ -Ionen, sie werden dem Test in ausreichender Konzentration mit der Enzymsuspension zugeführt (in 3,2 mol/l Ammoniumsulfat-Lösung).

G: Lactat-Dehydrogenase

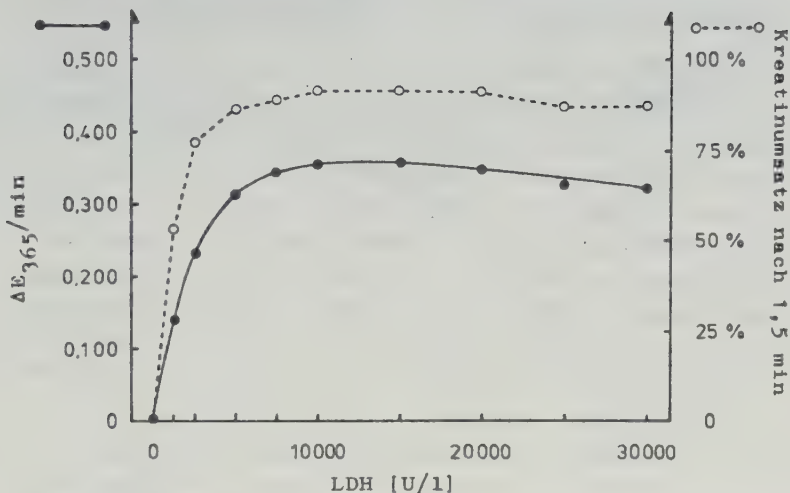
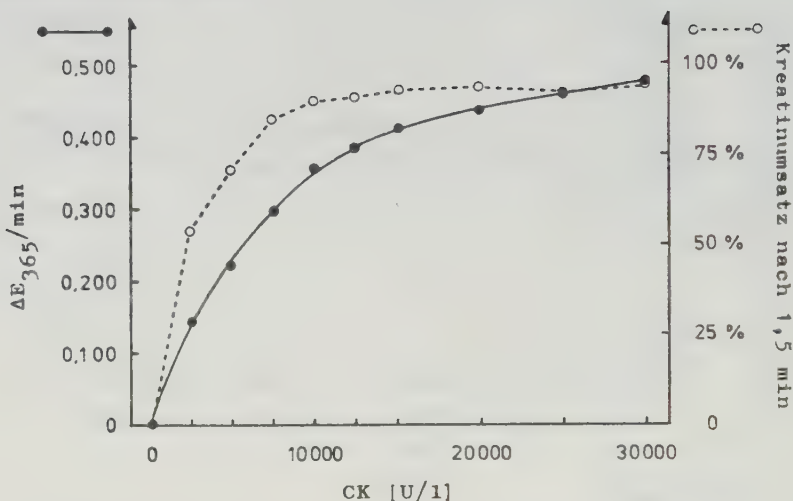


Abb. 3.09

Die Extinktionsänderung pro Minute und der Kreatinumsatz nach 1,5 Minuten in Abhängigkeit von der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität. Alle anderen Bedingungen entsprechen dem vorgeschlagenen Analysenansatz.

Bei einer Volumenaktivität der Lactat-Dehydrogenase zwischen 10 000 und 15 000 U/l lassen sich Maximalwerte für die Reaktionsgeschwindigkeit finden. Eine weitere Erhöhung der Enzymaktivität führt dagegen zu einer Abnahme von $v_{\text{eff.}}$. Im Test werden 10 443 U/l LDH eingesetzt, da dies bei der Herstellung der NADH/PK/LDH-Lösung technisch einfach ist (3.2.5.8. V).

H: Creatin-KinaseAbb. 3.10

Die Extinktionsänderung pro Minute und der Kreatinumsatz nach 1,5 Minuten in Abhängigkeit von der Creatin-Kinase-Aktivität. Alle anderen Bedingungen entsprechen dem vorgeschlagenen Analysenansatz.

Bei Auswertung nach BÜCHER ergibt sich mit steigender Aktivität der Creatin-Kinase auch eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit, allerdings verstreicht hier der Reaktionsbeginn immer mehr. Betrachtet man hingegen die Kurve des Kreatinumsatzes nach 1,5 min, so erkennt man einen weit flacheren Kurvenverlauf im Bereich $>10\,000\text{ U/l}$. Bei einer Enzymaktivität von $30\,000\text{ U/l}$ erhält man nur einen etwa 4% größeren Substratumsatz nach 1,5 min, verglichen mit einer CK-Aktivität von $10\,000\text{ U/l}$. Da Creatin-Kinase die teuerste Komponente im Ansatz ist, werden im Test nur $10\,127\text{ U/l}$ eingesetzt. Die damit erhaltenen Reaktionskurven sind gut auswertbar, haben nur eine sehr kurze Anlaufphase und verlaufen im Anfangsteil nahezu linear.

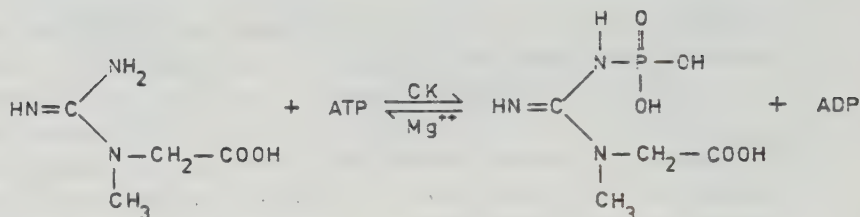
Das Enzym ist gegenüber Verunreinigungen mit Spuren von Eisen und Calcium sehr empfindlich.

3.2.5.5. Reaktionskinetik

Kreatin wird bei der hier beschriebenen neuen Methode zur enzymatischen Kreatinbestimmung in einem Endwert-Test mit nachgeschalteter Indikator-Reaktion bestimmt. Die Reaktionskette besteht aus drei gekoppelten Zwei-Substrat-Reaktionen. Um hierbei in relativ kurzer Zeit einen nahezu quantitativen Kreatinumsatz zu realisieren, benötigt man recht hohe Aktivitäten der Creatin-Kinase. Für den raschen Ablauf der Gesamtreaktion ist es zudem wichtig, daß die Geschwindigkeiten der Teilschritte der Reaktionskette möglichst schnell ins Gleichgewicht kommen, d. h. schnell einen stationären Zustand erreichen. Weiterhin müssen die Konzentrationen der intermediär gebildeten Produkte P_1 (ADP) und P_2 (Pyruvat) klein gehalten werden, damit keine Anlaufphasen bei den Teilreaktionen auftreten. Dies kann man nur durch den Einsatz von relativ viel Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase erreichen, da $V = k \cdot [E]$. Auf diese Weise wird die CK-Reaktion zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Unter den angegebenen Bedingungen gehorcht die Primär-Reaktion einer Kinetik pseudoerster Ordnung (pseudomonomolekulare Reaktion). Die Hilfs- und die Indikator-Reaktion sind 0.Ordnung. Die Umsatzkurve der Gesamtreaktion ist wie bei einer Reaktion 1.Ordnung im Verlauf gekrümmt und nähert sich dem Endwert asymptotisch. Die Zeit, die für 99%igen Kreatinumsatz benötigt wird, ist unabhängig von der Kreatinkonzentration im Testsystem.

In den nachfolgenden vereinfachten Berechnungen werden angenäherte Literaturwerte für die Michaelis-Konstanten (K_m) benutzt. Diese gelten nur unter gewissen Vorbehalten für den vorliegenden Fall. K_m ist nämlich keineswegs eine absolute Konstante, sondern hängt von pH, Temperatur, Effektoren, Puffer etc. ab (BERGMEYER 1974 und 1977). Etwa auftretende Substrat- oder Produkt-Inhibierungen bleiben bei der rechnerischen Abschätzung ebenfalls unberücksichtigt.

Die verwendeten Symbole und Einheiten sind im Verzeichnis der Abkürzungen aufgelistet (siehe hierzu auch BERGMEYER 1977).

Primär-Reaktion (Meß-Reaktion):

S ₁	S ₂		U	P ₁
Kreatin				Kreatinphosphat
16	0,5	0,6		Michaelis-Konstante mmol/l
0,064 max.	5,02	10,03		Konzentration im Test mmol/l
		10127		Enzym U/l

Das Enzym der Primär-Reaktion ist die Creatin-Kinase, es reagiert nach dem Zufallsmechanismus (random single-displacement reaction). Beide Substrate, Kreatin und ATP, werden am aktiven Zentrum des Enzym-Moleküls in beliebiger Folge gebunden und bilden einen ternären Komplex. Nach der Übertragung der Phosphatgruppe werden die beiden Produkte, Kreatinphosphat und ADP, in einem geschwindigkeitsbestimmenden zweiten Schritt ebenfalls in beliebiger Folge freigesetzt (LEHNINGER 1975).

Die Michaelis-Konstante für Kreatin ist hoch, sie beträgt $K_m = 1,6 \cdot 10^{-2}$ mol/l bei pH = 8,8, und die Wechselzahl des Enzyms ist klein (25000 mol Kreatin pro mol Enzym und min bei 38 °C) (BERGMEYER 1974). Im Testsystem sind bei der Serumbestimmung nur Kreatinkonzentrationen bis ungefähr $6,4 \cdot 10^{-5}$ mol/l zu erwarten, dies entspricht etwa 4 mg Kreatin/100 ml Serum. Die Substratkonzentration ist demnach sehr viel kleiner als die Michaelis-Konstante, $[S_1] \ll (K_m)_{S_1}$. Für ATP sind die Verhältnisse im Testsystem

ganz anders. Hier wird während des Reaktionsablaufs die ATP-Konzentration durch die hohe katalytische Aktivität der Pyruvat-Kinase konstant gehalten (ATP/ADP-Zyklus). Eine weitere Erhöhung der ATP-Konzentration in der Küvette über 5 mmol/l hinaus ist praktisch nicht mehr sinnvoll; sie führt zu einer Hemmung.

Im Test sind: $[S_1] \ll (K_m)_{S_1}$

$$[S_2] > (K_m)_{S_2} \quad \text{mit } [S_2] = \text{konstant}$$

Für die Zwei-Substrat-Reaktion gilt daher:

$$v_i = \frac{1}{1 + \frac{(K_m)_{S_1}}{[S_1]} + \frac{(K_m)_{S_2}}{[S_2]}} \cdot V$$

$$v_i = \frac{1}{1 + \frac{16}{0,064} + \frac{0,50}{5,02}} \cdot V$$

$$v_i \approx 0,004 \cdot V$$

oder für $[S_1] \ll (K_m)_{S_1}$ und $[S_2] \gg (K_m)_{S_2}$

$$v_i = \frac{[S_1]}{(K_m)_{S_1}} \cdot V = \frac{0,064}{16} \cdot V$$

$$v_i = 0,004 \cdot V$$

Dies ist die Formel für eine Ein-Substrat-Reaktion.

Mit den gegebenen Werten wird $\frac{(K_m)_{S_2}}{[S_2]} \approx 0,1$

und die Abweichung vom Idealfall $1 + \frac{(K_m)}{[S]} = 1$

beträgt 10%. Die Meß-Reaktion läßt sich daher näherungsweise wie eine Ein-Substrat-Reaktion behandeln.

Für das Testsystem wird gefordert: Die Primär-Reaktion soll geschwindigkeitsbestimmend sein und einer Kinetik pseudoerster Ordnung gehorchen. Für den stationären Zustand muß deshalb gelten:

$$(v_i)_{\text{prim.}} = 0,004 \text{ V}_{\text{prim.}} = (v_{\text{eff.}})_{\text{hilfs.}} = (v_{\text{eff.}})_{\text{ind.}}$$

Die in der Hilfs- und Indikator-Reaktion erscheinenden Produktkonzentrationen $[P_1]$ und $[P_2]$ sollen sehr klein gehalten werden. Toleriert man für die Messungen bei 365 nm eine Anlaufphase von $\Delta E = 0.005$, dann wird nach:

$$\Delta c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d}$$

$$\Delta c = [P_1] + [P_2] = \frac{0,005}{3,441 \cdot 10^{-1} \cdot 10} = 0,0015$$

$$[P_1] = [P_2] \approx 0,0008 \text{ mmol/l}$$

Es sind dann:

$$[P_1] \approx 0,004 \cdot (K_m)_{P_1} \quad [P_1] < (K_m)_{P_1}$$

$$[P_2] = 0,005 \cdot (K_m)_{P_2} \quad [P_2] < (K_m)_{P_2}$$

Hilfs-Reaktion:



P_1

S_3

S_2

P_2

Phosphoenolpyruvat

Pyruvat

0,21

0,032

Michaelis-Konstante
mmol/l

1,50

Konzentration
im Test mmol/l

10127

Enzym U/l

Im stationären Zustand sind:

$$[P_1] = \text{konstant} = 0,0008 \text{ mmol/l}$$

$$(v_{\text{eff.}})_{\text{hilfs.}} = 0,004 \cdot v_{\text{prim.}}$$

$$(v_{\text{eff.}})_{\text{hilfs.}} = \frac{v_{\text{hilfs.}} \cdot [S_3]}{(1 + Q_1) \cdot [S_3] + (K_m)_{S_3}}$$

Damit man $(K_m)_{S_3}$ vernachlässigen kann und eine Reaktion

0.Ordnung mit $(v_{\text{eff.}})_{\text{hilfs.}} = \frac{1}{1 + Q_1} \cdot v_{\text{hilfs.}}$ erhält,

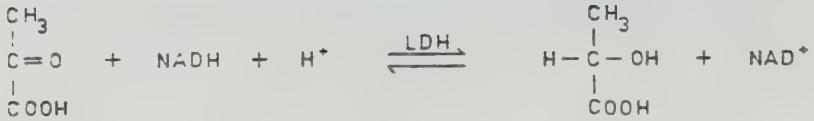
muß $(1 + Q_1) \cdot [S_3] \gg (K_m)_{S_3}$ sein.

$$\text{Mit } Q_1 = \frac{(K_m)_{P_1}}{[P_1]} = \frac{0,21}{0,0008} = 263 \text{ und } [S_3] = 1,5 \text{ mmol/l}$$

wird diese Forderung erfüllt, denn:

$$(1 + Q_1) \cdot [S_3] = 264 \cdot 1,5 = 396 \text{ mmol/l ist sehr groß gegenüber } (K_m)_{S_3} = 0,032 \text{ mmol/l.}$$

Man kann also bei der Hilfs-Reaktion mit der 0.Ordnung rechnen.

Indikator-Reaktion: P_2 S_4

Pyruvat

0,16

0,01

0,51

 P_3

W

Lactat

Michaelis-Konstante
mmol/lKonzentration
im Test mmol/l

10443

Enzym U/l

Im stationären Zustand sind:

$$[P_2] = \text{konstant} = 0,0008 \text{ mmol/l}$$

$$(v_{\text{eff.}})_{\text{ind.}} = 0,004 \cdot v_{\text{prim.}}$$

$$(v_{\text{eff.}})_{\text{ind.}} = \frac{v_{\text{ind.}} \cdot [S_4]}{(1 + Q_2) \cdot [S_4] + (K_m)_{S_4}}$$

Damit man auch hier $(K_m)_{S_4}$ vernachlässigen darf und eine

$$\text{Reaktion 0. Ordnung mit } (v_{\text{eff.}})_{\text{ind.}} = \frac{1}{1 + Q_2} \cdot v_{\text{ind.}}$$

erhält, muß $(1 + Q_2) \cdot [S_4] \gg (K_m)_{S_4}$ sein.

$$\text{Mit } Q_2 = \frac{(K_m)_{P_2}}{[P_2]} = \frac{0,164}{0,0008} = 205 \text{ und } [S_4] = 0,51 \text{ mmol/l}$$

wird diese Forderung erfüllt, denn:

$$(1 + Q_2) \cdot [S_4] = 206 \cdot 0,51 \approx 105 \text{ mmol/l ist sehr groß gegenüber } (K_m)_{S_4} = 0,01 \text{ mmol/l.}$$

Man kann also auch bei der Indikator-Reaktion mit der 0.Ordnung rechnen.

Bei einer katalytischen Aktivität der Creatin-Kinase von 10 127 U/l oder 168783 nkat/l im Testsystem ist

$$(v_1)_{\text{prim.}} = 0,004 \cdot 168783 = 675 \text{ nmol/s}.$$

Die effektiven Reaktionsgeschwindigkeiten der Hilfs- und der Indikator-Reaktion sollen im stationären Zustand gleich groß sein.

$$(v_1)_{\text{prim.}} = 0,004 \cdot v_{\text{prim.}} = (v_{\text{eff.}})_{\text{hilfs.}} = (v_{\text{eff.}})_{\text{ind.}}$$

$$v_{\text{hilfs.}} = (1 + Q_1) \cdot 0,004 \cdot v_{\text{prim.}} = 264 \cdot 675$$

$$v_{\text{hilfs.}} = 178200 \text{ nmol/s}$$

$$v_{\text{ind.}} = (1 + Q_2) \cdot 0,004 \cdot v_{\text{prim.}} = 206 \cdot 675$$

$$v_{\text{ind.}} = 139050 \text{ nmol/s}$$

Im Test sind deshalb einzusetzen:

<u>Hilfs-Reaktion</u>	PK	b = 178 μ kat/s
		oder <u>10680 U/l</u>

<u>Indikator-Reaktion</u>	LDH	b = 139 μ kat/s
		oder <u>8340 U/l</u>

Trotz der vielen Vereinfachungen bei dieser Abschätzung stimmen die so gewonnen Werte gut mit den experimentell gefundenen überein. Im Meßsystem werden die Creatin-Kinase und die Pyruvat-Kinase mit einer Volumenaktivität von je 10127 U/l und die Lactat-Dehydrogenase mit einer Volumenaktivität von 10443 U/l eingesetzt.

Berechnung der Reaktionszeiten für 99%igen und 99,9%igen

Kreatinumsatz

Es gelten die aufgeführten Testbedingungen. Die Primär-Reaktion ist 1.Ordnung, die Hilfs- und Indikator-Reaktion sind 0.Ordnung.

$$\text{Kreatin: } [S_1] \ll (K_m)_{S_1} \quad (K_m)_{S_1} = 16 \text{ mmol/l}$$

$$\text{zu Reaktionsbeginn } [S_1]_0 = 6,4 \cdot 10^{-2} \text{ mmol/l}$$

$$\text{nach 99\% Umsatz } [S_1]_t = 6,4 \cdot 10^{-4} \text{ mmol/l}$$

$$\text{nach 99,9\% Umsatz } [S_1]_t' = 6,4 \cdot 10^{-5} \text{ mmol/l}$$

$$[S_1]_0 = \frac{6,4 \cdot 10^{-2}}{16} \cdot K_m$$

$$[S_1]_0 = 4 \cdot 10^{-3} K_m$$

$$[S_1]_0 = 0,004 K_m$$

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{[S] + K_m}$$

$$v_i = \frac{[S]}{1,004 K_m}$$

Dies entspricht einer unkatalisierten Reaktion 1.Ordnung, für die gilt:

$$t = \frac{1}{k} \cdot \ln \frac{a}{a - x}$$

$$k = \frac{V}{1,004 K_m}$$

$$K_m = 16 \text{ } \mu\text{mol/ml}$$

$$k = \frac{V}{1,004 K_m} = \frac{V}{1,004 \cdot 16}$$

$$k = 0,062 V \text{ ml/min}$$

Statt V kann man die katalytische Aktivität des Enzyms einsetzen. Pro ml Testansatz werden 10,127 U CK verwendet.

Für 99%igen Kreatinumsatz gilt:

$$t = \frac{1}{0,062 \cdot 10,127} \cdot \ln \frac{6,4 \cdot 10^{-2}}{6,4 \cdot 10^{-4}}$$

$$t = \frac{2,3}{0,628} \cdot \lg \frac{6,4 \cdot 10^{-2}}{6,4 \cdot 10^{-4}}$$

$$t = 3,66 \cdot \lg 10^2$$

$$t = 3,66 \cdot 2$$

$$\underline{\underline{t = 7,3 \text{ min}}} \quad \text{für 99%igen Kreatinumsatz}$$

Die Reaktionszeit für 99%igen Kreatinumsatz ist unter den gewählten Bedingungen unabhängig von der Ausgangskonzentration, sofern sie klein gegenüber K_m ist. Für 99,9%igen Umsatz werden etwa 11 min benötigt ($\lg 10^3 = 3$). Auch diese Zeitangaben decken sich mit den experimentellen Befunden.

3.2.5.6. Notwendige Geräte

Es werden alle für die vorliegende Arbeit benutzten Geräte und Verbrauchsmaterialien angeführt. Für die Durchführung des Testverfahrens sind aber nur die durch einen schwarzen Punkt • gekennzeichneten Geräte unbedingt erforderlich.

- Photometer Eppendorf 1101 (oder anderes Spektrallinien-Photometer)
 Küvettenwechselautomat Eppendorf 2702, temperierbar
 Küvettenthermostateinrichtung Haake Typ F
 Kompensationsschreiber Eppendorf 4412
 Transformationsstufe Eppendorf 1853
- Filter : 365 nm oder 334 nm
 SARSTEDT cuvettherm
- Centrifuge Eppendorf 5412 (12 000 U/min), Tischzentrifuge
 Analysenwaage Mettler
 Exsikkator (Silicagel) und Wägegläser
- Kühlschrank und Gefrierschrank
- pH-Meter E 520 (Metrohm Herisau)
 Rotationsmischer Eppendorf 3300
- Kolbenhubpipetten (Eppendorf): 1,000 ml, 0,500 ml,
 0,250 ml, 0,200 ml, 0,100 ml, 0,020 ml
 (Die Überprüfung der Kolbenhubpipetten erfolgte gravimetrisch)
- Eppendorf Reaktionsgefäße 3810 (1,5 ml)
 Eppendorf Reaktionsgefäße 3812 (2,2 ml)
- Halbmikroküvetten ratiolab Nr. 1201 ($10 \times 4 \times 45 \text{ mm}^3$)
- Rühr-Spatel SARSTEDT
- Mikrospatel
- Meßkölbchen 25 ml
- Meßkölbchen 50 ml
- Becherglas 50 ml
- Fläschchen aus braunem Spezialglas 50 ml

3.2.5.7. Notwendige Reagenzien

- 1) Uranylacetatlösung 1,6% zur Analyse, 11 = 1,01 kg
 $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{UO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Mol.-Gew. 424,15
 MERCK 9425
- 2) Glycylglycin Puffersubstanz
 $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ Mol.-Gew. 132,12
 MERCK 4233
- 3) Magnesiumacetat zur Analyse
 $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Mol.-Gew. 214,46
 MERCK 5819
- 4) 1 N Natronlauge Titrisol^R (1 mol/l)
 MERCK 9956
- 5) Adenosin-5'-triphosphat (ATP), kristallisiertes Dinatriumsalz
 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ Mol.-Gew. 605,2
 BOEHRINGER MANNHEIM 127 531
- 6) Phosphoenolpyruvat (PEP), kristallisiertes Tri-cyclohexylammoniumsalz
 $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_6\text{P} \cdot (\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N})_3$ Mol.-Gew. 465,3
 BOEHRINGER MANNHEIM 128 104
- 7) β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH), reduziert
 Dinatriumsalz, Grad I, 99% $\text{NADH} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Mol.-Gew. 745,4
 BOEHRINGER MANNHEIM 107 727
- 8) Pyruvat-Kinase (PK) aus Kaninchenmuskel
 ATP:pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7.1.40
 Kristallsuspension in Ammoniumsulfat-Lösung, 3,2 mol/l
 Spezifische Aktivität ca. 200 U/mg (25°C; PEP als Substrat) 100 mg(10ml)
 BOEHRINGER MANNHEIM 128 163
- 9) Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus Kaninchenmuskel
 L-Lactat:NADoxidoreductase, EC 1.1.1.27
 Kristallsuspension in Ammoniumsulfat-Lösung, 3,2 mol/l
 Spezifische Aktivität ca. 550 U/mg (25°C; Pyruvat als Substrat) 25mg(5ml)
 BOEHRINGER MANNHEIM 127 876

- 10) Creatin-Kinase (CK) aus Kaninchenmuskel
ATP:creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2
Lyophilisat, stabilisiert
Spezifische Aktivität ca. 25 U/mg Lyophilisat
(25°C; Creatin und ATP als Substrate) 100 mg
BOEHRINGER MANNHEIM 127 566
- 11) Kreatin (Monohydrat) reinst
 $C_4H_9N_3O_2 \cdot H_2O$ Mol.-Gew. 149,15
MERCK 5205
- 12) Creatine Standard 4,0 µmoles Creatine No. 520-60
"For use in Sigma Creatine Phosphokinase Method
No. 520"
SIGMA CHEMICAL COMPANY, ST. LOUIS, U.S.A.

Die Reagenzien 5 bis 12 sind teilweise recht empfindlich gegenüber Licht, Feuchtigkeit und Wärme, sie werden deshalb in einem kleinen Exsikkator über Silicagel im Kühlschrank aufbewahrt. Zum Ansetzen der Lösungen müssen die verschlossenen Präparategläschen vor dem Öffnen erst auf Raumtemperatur gebracht werden. Anderenfalls würden hygroskopische Substanzen während des Einwiegens Kondenswasser aufnehmen.

3.2.5.8. Herstellung der Lösungen

Bei der Herstellung der Reagenzien-Lösungen ist zu beachten, daß die Enzymsuspensionen und das CK-Lyophilisat nur mit eiskaltem Glycylglycin-Puffer zu verdünnen bzw. zu lösen sind. Die Puffer-Lösungen und der Reagenzien-Mix werden in sorgfältig gereinigten und ausgedämpften Fläschchen aus braunem Spezialglas im Kühlschrank aufbewahrt. Man kann hierzu recht gut leere Flaschen von handelsüblichen Testansätzen verwenden.

I. Uranylacetat-Lösung 0,8% zum Enteiweißen; Vorsicht giftig!

25 ml der 1,6 %igen Uranylacetat-Lösung mit 25 ml H_2O dest. bzw. 25 ml 1,8 %iger NaCl-Lösung auf 50 ml auffüllen. In einer braunen Glasflasche aufbewahren.

Das Enteiweißungsmittel ist bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank unbegrenzt haltbar.

II. Glycylglycin-Puffer, 0,5 mol/l

1651,5 mg Glycylglycin (2) in 18 ml destilliertem Wasser und 4,5 ml Natronlauge (4), NaOH, 1 mol/l) lösen. Mit 1 mol/l NaOH auf pH = 8,3 mittels pH-Meter einstellen. In einem geeichten 25 ml-Glaskölbchen auf 25 ml mit destilliertem Wasser auffüllen, pH kontrollieren und gegebenenfalls mit NaOH korrigieren.

Puffer bei + 4 °C etwa 4 Wochen haltbar.

III. Glycylglycin-Puffer, 0,125 mol/l

5,0 ml Glycylglycin-Puffer, 0,5 mol/l (II) mit 14 ml H₂O dest. verdünnen und mit NaOH auf pH = 8,3 einstellen. In ein geeichtetes 20 ml-Meßkölbchen überführen und mit destilliertem Wasser auf 20 ml auffüllen.

Puffer bei + 4 °C etwa 4 Wochen haltbar.

IV. Reagenzien-Mix

- a) 170 mg Magnesiumacetat (3) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß einwiegen und in 1 ml H₂O dest. lösen.
- b) 240 mg Adenosin-5'-triphosphat (5) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß einwiegen und in 2 ml H₂O dest. lösen.
- c) 55 mg Phosphoenolpyruvat (6) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß einwiegen und in 2 ml H₂O dest. lösen.

In ein kleines Becherglas 19 ml Glycylglycin-Puffer, 0,500 mol/l (II) füllen und die wäßrigen Mg⁺⁺-, ATP- und PEP-Lösungen (a), b) und c)) verlustlos dazugeben. Gut mischen, pH kontrollieren und gegebenenfalls mit NaOH auf pH = 8,3 einstellen. Reagenzien-Mix in ein geeichtetes 25 ml-Meßkölbchen überführen und mit H₂O dest. auf 25 ml auffüllen.

Die Reagenzien-Mix-Lösung ist etwa 2 Monate bei + 4 °C haltbar. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit beträgt gegenüber der frisch zubereiteten Lösung nach 1 Monat etwa 2,5% und nach 2 Monaten 5%.

V. NADH/PK/LDH-Lösung

In ein Eppendorf Reaktionsgefäß 30 mg β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (7) einwiegen und mit 1,300 ml Glycylglycin-Puffer, 0,125 mol/l (III) lösen. Zu der NADH-Lösung 0,400 ml PK-Suspension (8) und 0,300 ml LDH-Suspension (9) geben, gut mischen und eventuelle Trübungen kurz abzentrifugieren. Den Überstand in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß umfüllen und dieses selbst während der Messungen im Kühlschrank belassen. Die NADH/PK/LDH-Lösung ist im Kühlschrank bei + 4°C etwa 4 Wochen stabil. Nach 2 Wochen hat sich die NADH-Extinktion, der zur Messung mit 0,770 ml H₂O verdünnten Lösung, nicht wesentlich verändert. Mit 4 Wochen alter Lösung werden noch 95% der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit gemessen, bei vollständigem Substratumsatz. Es empfiehlt sich aber, insbesondere bei älteren NADH/PK/LDH-Lösungen, den maximal möglichen Kreatinumsatz mit einer reinen Kreatin-Lösung höherer Konzentration zu überprüfen. Dies kann auch im Anschluß an die Kreatinbestimmung durch Einmischen von 0,020 ml einer Kreatin-Lösung bekannter Konzentration geschehen. Nach längerer Lagerung sollen Inhibitoren des NADH-Präparates auftreten, die besonders die LDH hemmen können (BERGMEYER 1977).

VI. CK-Lösung

32 mg Creatin-Kinase (10) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß einwiegen und mit 2 ml Glycylglycin-Puffer, 0,125 mol/l (III) lösen. Eventuelle Trübungen nach sorgfältigem Mischen kurz abzentrifugieren und den Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß füllen. Die CK-Lösung sollte auch während der Messungen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die CK-Lösung ist bei + 4°C mit geringem Aktivitätsverlust etwa 3 Monate haltbar.

VII. Kreatin-Lösung

Die Richtigkeitskontrolle erfolgt mit selbst hergestelltem Kreatin-Standard (11). Auf die Bereitung

von wäßrigen Kreatin-Standard-Lösungen und aufgestockten Pool-Seren wurde schon eingegangen (3.2.5.1. und 3.2.5.2.). Weit einfacher ist die Verwendung des "Creatine Standard 4,0 μ moles" (12). Löst man den, der Glaswand der Fläschchen anhaftenden, feinen Belag von Kreatin mit 5 bzw. 10 ml destilliertem Wasser durch vorsichtiges Schwenken des verschlossenen Gläschens, so erhält man eine wäßrige Kreatin-Lösung von 0,800 bzw. 0,400 mmol/l. Gibt man hiervon 0,020 ml zum Serum (vor der Enteiweißung), so entsteht ein aufgestocktes Serum mit einer zusätzlichen Kreatinkonzentration von 0,064 bzw. 0,032 mmol/l (0,84 bzw. 0,42 mg/100 ml). Das zusätzliche Volumen von 0,020 ml ist bei der Berechnung zu berücksichtigen ($F = 3,08$; siehe 3.2.5.10.).

Der Inhalt der Fläschchen kann auch direkt mit 10 ml Pool-Serum gelöst werden. Man erhält so ein aufgestocktes Pool-Serum mit einer zusätzlichen Konzentration von 0,400 mmol Kreatin/l Serum (Δ 5,25 mg/100 ml). Durch Weiterverdünnen dieses Serums mit demselben Pool-Serum lassen sich Seren unterschiedlicher Kreatinkonzentration gewinnen. Diese sind gut für die Kontrolle von Präzision und Richtigkeit geeignet.

Wäßrige Kreatin-Lösungen und aufgestockte Seren müssen in kleinen Portionen eingefroren werden. Sie sind bei -20°C mindestens 2 Jahre haltbar.

Die aufgeführten Lösungen sind für 100 Kreatinbestimmungen in Serum oder Urin ausgelegt. Alle Ansätze und Konzentrationen im Test können auch der Tabelle 3.09 entnommen werden.

STOFF	Mol. -Gew.	Stammlösungen für 100 Kreatininbestimmungen				Testbedingungen in der Küvette 0,790 ml			
		ml	mmol/l	mg/l	mmol	mg	ml	mmol/l	mg/l
I Uranylacetat 0,8%	424,15	50,0	19,0	8080	0,95	404,0	0,50 Überstand nach Enteiveweißung		
II Glycylglycin	132,12	25,0	500,0	66060	12,50	1651,5			
III Glycylglycin	132,12	20,0	125,0	16515	2,50	330,3			
IV <u>Reagenzien-Mix</u> pH = 8,3		25,0					0,25		
Glycylglycin II	132,12	19,0	380,0	50206	9,50	1255,1	Total	125,44	16576
Mg-Acetat	214,46	1,0	31,7	6800	0,79	170,0		10,03	2152
ATP	605,2	2,0	15,9	9600	0,40	240,0		5,02	3038
PyP	465,3	2,0	4,7	2200	0,12	55,0		1,50	696
V <u>NADH/PK/LDH-Lsg.</u>		2,0					0,02		
Glycylglycin III	132,12	1,3	81,2	10725	0,16	21,5			
NADH	745,4		20,1	15000	0,04	30,0		0,51	380
PK	200 U/mg 100 mg/10 ml	0,4	400000	2000	800 U	4,0		10127 U/l	51
LDH	550 U/mg 25 mg/5 ml	0,3	412500	750	825 U	1,5		10443 U/l	19
VI <u>CK-Lösung</u>		2,0					0,02		
Glycylglycin III	132,12	2,0	125,0	16515	0,25	33,0			
CK	25 U/mg		400000	16000	800 U	32,0		10127 U/l	405
									8,00 U
									0,320

Tab. 3.09

3.2.5.9. Durchführung des Tests

Durch die Verwendung eines Photometers mit Küvettenwechselautomat und Kompensationsschreiber ist es möglich jeweils 6 Proben gleichzeitig zu bestimmen. In 6 Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 ml) pipettiert man je 0,250 ml Serum und fügt zur Enteiweißung 0,500 ml 0,8%ige Uranylacetatlösung (I) hinzu. Die verschlossenen Reaktionsgefäße werden zum Mischen kurz von Hand geschwenkt und für 30 Sekunden auf dem Rotationsmischer geschüttelt. Der Inhalt der Kunststoffgefäße ist nun gelbweiß gefärbt und milchig undurchsichtig. Durch 5minütiges Zentrifugieren in der Tischzentrifuge bei 12000U/min wird ein klarer Überstand über einem blaßgelben Bodenkörper erhalten. Da das Präzipitat der Gefäßwand relativ fest anhaftet, lassen sich 0,500 ml des Überstands mit einer Kolbenhubpipette leicht entnehmen und in eine Halbmikroküvette überführen. Um Verwechslungen zu vermeiden sind die Einmalküvetten mit dem Filzschreiber zu kennzeichnen. In 2 weiteren Arbeitsgängen pipettiert man zum Küvetteninhalt jeweils 0,250 ml Reagenzien-Mix (IV) sowie 0,020 ml NADH/PK/LDH-Lösung (V) und mischt sorgfältig mit einem Rühr-Spatel. Die Küvetten werden nun in den auf 25 °C temperierten 6fach-Küvettenwechselautomat gesetzt. In dieser Phase laufen die Vorreaktionen ab, die sich durch die Anwesenheit von Pyruvat und ADP im Analysensystem ergeben. Auf Grund der hohen Enzymaktivitäten sind diese Reaktionen nach etwa 5 min abgelaufen. Nach nochmaligem Mischen werden die Rühr-Spatel aus den Küvetten herausgenommen. An der Transformationsstufe wählt man für Serien zweckmäßigerweise einen Meßbereich von E 0 - 0,250 oder E 0 - 0,500. Dabei wird am Photometer so eingestellt, daß die für die einzelnen Küvetten gemessenen Extinktionen am Oberrand der Skala zu liegen kommen. Dann startet man die Aufzeichnung der Extinktionen am Kompensationsschreiber. Der Küvettenwechselautomat führt die Proben periodisch durch den Strahlengang des Photometers. Bei einer Registrierdauer von 6 s erscheint jede Küvette alle 30 s im Lichtweg. Wenn der gewählte Papiervor-

schub 1 cm/min beträgt, werden die Extinktionen durch einen 0,1 cm langen Strich aufgezeichnet. Spätestens 10 min nach dem Zumischen der NADH/PK/LDH-Lösung ergibt sich ein konstanter Meßwert bzw. eine geringe Extinktionsabnahme, die aber pro Zeiteinheit gleich groß ist. Die eigentliche Meß-Reaktion kann jetzt durch die Zugabe von 0,020 ml Creatin-Kinase-Lösung (VI) gestartet werden. Hierzu wird die Wechselautomatik ausgeschaltet wenn sich die gewünschte Küvette im Lichtweg befindet. Während des Einpipettierens des Enzyms empfiehlt es sich den Strahlengang des Photometers kurz zu schließen und nach dem Mischen mit dem Rühr-Spatel sofort wieder zu öffnen. Bei einer gewissen Übung dauert der gesamte Vorgang weniger als 6 s. Die Meß-Reaktion setzt mit dem Einmischen der Creatin-Kinase ein. Man kann auf der Kurvenschreibung einen initialen Extinktionssprung, der durch die Verdünnung mit der CK-Lösung zustande kommt, eine sehr kurze Induktionsperiode und daran anschließend einen fast linearen Extinktionsabfall verfolgen. Nach dem Start der Meß-Reaktionen in allen 6 Proben stellt man die Wechselautomatik wieder ein und läßt die Extinktionsänderungen für weitere 15 bis 25 min aufzeichnen. Die Auswertung der Endwert-Bestimmungen erfolgt an Hand des Schreiberprotokolls. Die Meß-Reaktion ist nach etwa 10 min vollständig abgelaufen und man würde nach diesem Zeitpunkt keine weitere Extinktionsänderung mehr erwarten. Aus nicht immer erklärlichen Gründen kommt es aber bei der Bestimmung von Substraten in biologischem Material zu einem inkonstanten Endwert, die Extinktion "schleicht". Der zu messenden Reaktion ist eine störende Reaktion überlagert. Das verwendete Enzym kann Fremdaktivitäten enthalten, die andere Substanzen der Probe mitreagieren lassen, oder es besitzt "NADH-Oxidase" (BERGMEYER 1977). Bei der Kreatinbestimmung ergibt sich ein gleichsinniger "Schleich", der sich linear mit der Zeit ändert. Zur Bestimmung der wahren Extinktionsänderung ΔE muß deshalb auf den Zeitpunkt t_0 der CK-Zugabe extrapoliert werden. Dies ist bei Kurvenaufzeichnung leicht durchzuführen (Abb. 3.12). Man zieht mit dem Lineal eine Gerade durch die dargestellten Kurvenpunkte des "Schleichts" bis

zum Start der Meß-Reaktion. Die so gewonnene Extinktionsänderung ΔE ist die gesuchte Meßgröße, sie ist der Kreatinkonzentration in der Küvettenflüssigkeit direkt proportional. ΔE kann mit einem Dreikant-Spezialmaßstab (Fa. Rumold), entsprechend der am Kompensationsschreiber gewählten Skalenspreizung, abgelesen werden. Wird keine Kurvenschreibung durchgeführt, muß man die Extinktion nach CK-Zugabe (E_1) sowie die Extinktionen nach 15 min (E_2) und 25 min (E_3) ablesen. Die wahre Extinktionsänderung ΔE berechnet sich nach:

$$\Delta E = (E_1 - E_3) - 2,5 \cdot (E_2 - E_3)$$

Kann die Extinktion E_1 (direkt nach CK-Zugabe) nicht gemessen werden, so ist der Extinktionssprung durch nochmalige Zugabe von 0,020 ml Creatin-Kinase-Lösung nach Reaktionsablauf zu ermitteln. Dieser Wert ist von der Ausgangsextinktion vor Reaktionsbeginn (E_0) zu subtrahieren.

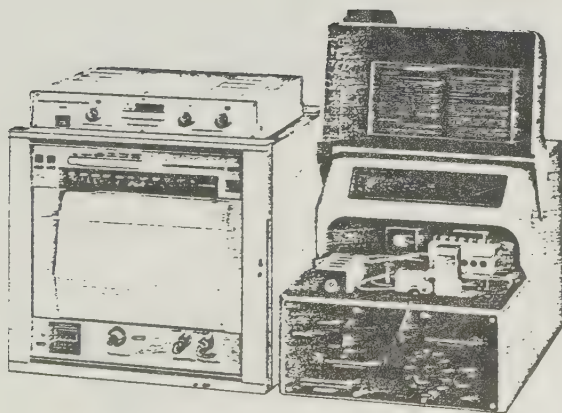


Abb. 3.11

Photometrischer Meßplatz mit 6fach-Küvettenwechselautomat und Analog-Registrierung (aus EPPENDORF Bedienungsanleitung)



Abb. 3.12

Graphische Ermittlung der Extinktionsänderung ΔE

EG = Extrapolations-Gerade durch die Kurvenpunkte
bei inkonstantem Endwert (siehe Text)

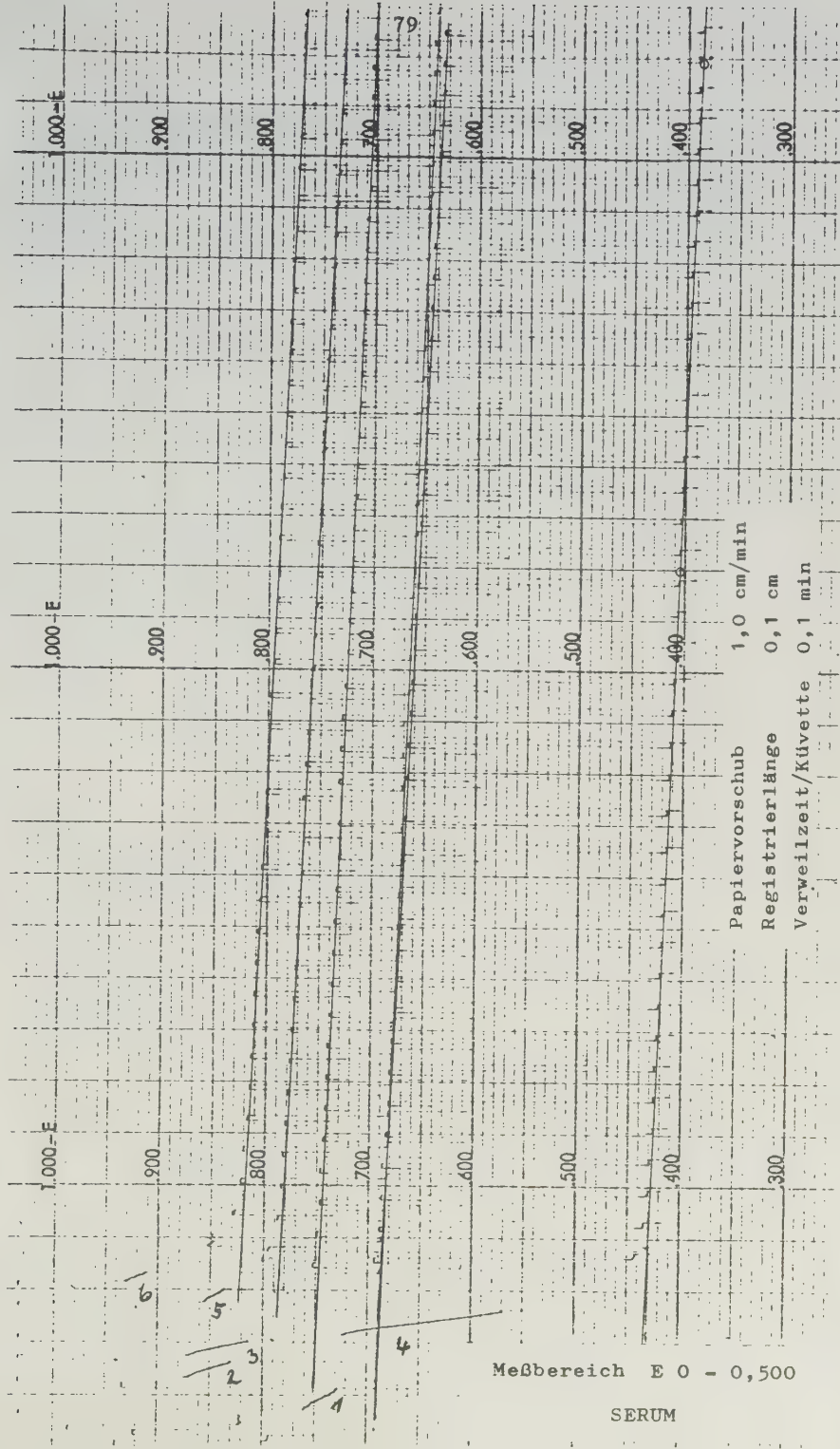


Abb. 3.13

Schreiberprotokoll

3.2.5.10. Berechnung der Kreatinkonzentration im Serum

Die Kreatinkonzentration im Serum läßt sich aus der gemessenen Extinktionsänderung ΔE mit Hilfe der folgenden Formeln berechnen, die sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergeben.

$$c = \Delta E \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \quad \text{mmol/l Serum}$$

bzw.

$$c = \Delta E \cdot \frac{\text{MG}}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \quad \text{mg/l Serum}$$

Es sind:

- c = Substanzkonzentration, mmol/l, mg/l
- ΔE = Extinktionsänderung, 1
- MG = Gewicht eines Millimols, mg/mmol
- ϵ = Extinktionskoeffizient, $\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$
- d = Schichtdicke, mm
- V = Testvolumen, ml
- v = Probevolumen im Test, ml
- F = Enteiweißungsfaktor, 1

$$F = \frac{\text{Volumen Serum} + \text{Volumen Enteiweißungsmittel}}{\text{Volumen Serum}}$$

Im Test werden 0,250 ml Serum mit 0,500 ml Uranylacetat-Lösung enteiweißt:

$$F = \frac{0,250 + 0,500}{0,250} = 3$$

Für die Messung bei 365 nm gilt:

$$\epsilon = 3,441 \cdot 10^{-1} \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$$

$$c = \Delta E \cdot \frac{1}{3,441 \cdot 10^{-1} \cdot 10} \cdot \frac{0,790}{0,500} \cdot 3 \quad \text{mmol/l Serum}$$

$$c = \underline{\Delta E \cdot 1,378 \text{ mmol/l Serum}}$$

$$c = \Delta E \cdot \frac{131,14}{3,441 \cdot 10^{-1} \cdot 10} \cdot \frac{0,790}{0,500} \cdot 3 \quad \text{mg/l Serum}$$

$$c = \Delta E \cdot 180,65 \quad \text{mg/l Serum}$$

oder

$$c = \Delta E \cdot 18,065 \quad \text{mg/100 ml Serum}$$

Für die Messung bei 334 nm gilt:

$$\varepsilon = 6,18 \cdot 10^{-1} \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$$

$$c = \Delta E \cdot \frac{1}{6,18 \cdot 10^{-1} \cdot 10} \cdot \frac{0,790}{0,500} \cdot 3 \quad \text{mmol/l Serum}$$

$$c = \Delta E \cdot 0,767 \quad \text{mmol/l Serum}$$

$$c = \Delta E \cdot \frac{131,14}{6,18 \cdot 10^{-1} \cdot 10} \cdot \frac{0,970}{0,500} \cdot 3 \quad \text{mg/l Serum}$$

$$c = \Delta E \cdot 100,58 \quad \text{mg/l Serum}$$

oder

$$c = \Delta E \cdot 10,058 \quad \text{mg/100 ml Serum}$$

Kreatinkonzentration im Serum

λ	365 nm	334 nm	
c =	$\Delta E \cdot 1,378$	$\Delta E \cdot 0,767$	mmol/l
c =	$\Delta E \cdot 18,065$	$\Delta E \cdot 10,058$	mg/100 ml

(Extinktionskoeffizienten aus ZIEGENHORN et al. 1976)

3.2.5.11. Präzision in der Serie

Zur besseren Vergleichbarkeit mit den anderen beschriebenen Methoden zur enzymatischen Kreatininbestimmung wurden alle Serienanalysen mit dem selben Pool-Serum und aufgestockten Pool-Seren durchgeführt.

Kreatin	Pool	Pool + 0,5		Pool + 1,0		Pool + 2,0	
	mg/100ml	mg/100ml	Diff.	mg/100ml	Diff.	mg/100ml	Diff.
I	0,63	1,12	0,49	1,66	1,03	2,64	2,01
II	0,65	1,12	0,47	1,63	0,98	2,66	2,01
III	0,63	1,12	0,49	1,64	1,01	2,66	2,03
IV	0,63	1,16	0,53	1,63	1,00	2,62	1,99
V	0,63	1,12	0,49	1,63	1,00	2,62	1,99
VI	0,63	1,12	0,49	1,64	1,01	2,64	2,01
VII	0,63	1,12	0,49	1,64	1,01	2,64	2,01
VIII	0,61	1,10	0,49	1,63	1,02	2,62	2,01
IX	0,63	1,14	0,51	1,63	1,00	2,62	1,99
X	0,63	1,14	0,51	1,64	1,01	2,64	2,01

n = 10

$\bar{x}$	0,63	1,13	0,50	1,64	1,01	2,64	2,01
s	0,009	0,016	0,016	0,009	0,013	0,016	0,013
VK %	1,43	1,42		0,55		0,61	
Wieder-			0,50		1,01		2,01
findung			100,0 %		101,0 %		100,5 %
R %			± 0		+ 1,0		+ 0,5
+ 3s	0,66	1,18		1,67		2,69	
- 3s	0,60	1,08		1,61		2,59	

Tab. 3.10

Erwartungsgemäß werden für die niedrigeren Kreatinkonzentrationen höhere Variationskoeffizienten gefunden, sie sind aber in keinem Fall größer als 1,5 %. Die schlechtesten Ergebnisse bei den Wiederfindungsversuchen ergeben sich mit 0,50 mg Kreatin/100 ml (maximaler Fehler ± 6 %).

3.2.5.12. Präzision von Tag zu Tag und Richtigkeit

Für die tägliche Bestimmung der Präzision wird ein Pool-Serum mit einer Kreatinkonzentration von 0,70 mg/100 ml verwendet. Im pathologischen Bereich erfolgt die Kontrolle der Präzision mit 2 aufgestockten Pool-Seren. Zur Ermittlung der Richtigkeit muß man vom Meßwert für das aufgestockte Serum den dazugehörigen Meßwert für das Pool-Serum subtrahieren. Diese Differenzen sind in der jeweils zweiten Zeile der Tabelle 3.11 unter "Diff." aufgelistet. Üblicherweise werden die täglichen Kontrollen in einer Kontrollkarte graphisch dokumentiert.

Kreatin	Pool mg/100ml	Pool + 2,0		Pool + 4,0	
		mg/100ml		mg/100ml	
		Diff.		Diff.	
1	0,70	2,73	2,03	4,73	4,03
2	0,70	2,69	1,99	4,64	3,94
3	0,72	2,75	2,03	4,71	3,99
4	0,70	2,67	1,97	4,73	4,03
5	0,70	2,67	1,97	4,64	3,94
6	0,70	2,71	2,01	4,73	4,03
7	0,72	2,73	2,01	4,70	3,98
8	0,70	2,69	1,99	4,71	4,01
9	0,70	2,67	1,97	4,59	3,89
10	0,70	2,71	2,01	4,64	3,94
11	0,70	2,66	1,96	4,70	4,00
12	0,72	2,69	1,97	4,73	4,01
13	0,69	2,66	1,97	4,66	3,97
14	0,70	2,66	1,96	4,71	4,01
15	0,70	2,71	2,01	4,71	4,01
16	0,72	2,73	2,01	4,70	3,98
17	0,70	2,66	1,96	4,73	4,03
18	0,70	2,73	2,03	4,70	4,00
19	0,70	2,71	2,01	4,70	4,00
20	0,70	2,73	2,03	4,71	4,01
n = 20					
$\bar{x}$	0,70	2,70	2,00	4,69	3,99
s	0,009	0,030	0,026	0,039	0,038
VK %	1,29	1,11		0,83	
Wieder- findung			2,00 100,0 %		3,99 99,8 %
R %			± 0		- 0,25
+ 3s	0,73	2,79		4,81	
- 3s	0,67	2,61		4,57	
Tab. 3.11					

3.2.5.13. Linearität der Eichfunktion

Theoretisch wäre es möglich, mit dem Testsystem bis etwa 0,5 mmol Kreatin pro Liter Küvettenflüssigkeit zu bestimmen. Dies entspräche einer Serum-Kreatinkonzentration von ungefähr 32 mg/100 ml. Limitierend ist die Konzentration von NADH, die man aus bereits erörterten Gründen nicht weiter erhöhen kann. Zudem werden in den Vorreaktionen ADP und Pyruvat unter NADH-Verbrauch aus dem Ansatz entfernt. Andererseits kann der Kompensationsschreiber ohne Umschaltung nur Extinktionsänderungen bis $\Delta E = 1.000$ aufzeichnen. So hohe Meßwerte sind aber keineswegs bei Serumbestimmungen zu erwarten ($\Delta E = 1.000 \hat{=} 18,065$ mg/100 ml Serum), sondern werden erst bei Urinbestimmungen erreicht ($\Delta E = 1.000 \hat{=} 30,108$ mg/100 ml Urin). Urinproben, die die angegebenen Kreatinkonzentrationen überschreiten, müssen entsprechend verdünnt werden. Die Linearität der Eichfunktion wird deshalb nur bis $\Delta E = 1.000$ verfolgt. Gemäß den Bedingungen für eine Reaktion 1. Ordnung ist die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der Kreatinkonzentration im Ansatz abhängig. Experimentell läßt sich zeigen, daß dies zutrifft. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Kreatinkonzentration zu (vgl. Abb. 3.13). Die Zeit, die für einen Substratumsatz von 99% benötigt wird, ist unabhängig von der Kreatinkonzentration im Test.

Aufstockungsversuche wurden mit wäßrigen Lösungen, Urinen und Seren unternommen. Die Ergebnisse sind den Tabellen 3.12 bis 3.14 sowie den Abbildungen 3.14 und 3.15 zu entnehmen. Bei den Versuchen mit aufgestockten Seren wurde das Kreatin, in jeweils 0,250 ml destilliertem Wasser gelöst, zu 0,250 ml Serum gemischt. Erst danach erfolgte die Enteiweißung mit 0,250 ml Uranylacetat-Lösung, 1,6%. Die weitere Behandlung der Proben folgte der Vorschrift für Seren. Für verschiedene Seren und Humanalbumin (Gesamteiweiß zwischen 6 und 12 g/100 ml) wurden gleiche Ergebnisse gefunden. Es kam zu keiner Mitfällung von Kreatin durch die Verwendung von Uranylacetat. Da die Seren selbst Kreatin enthalten, muß die dafür gemessene Extinktionsänderung ΔE_S

vom jeweiligen Meßwert ΔE_G subtrahiert werden ($\Delta E_G - \Delta E_S$). Die so ermittelten Extinktionsänderungen nehmen linear über den gesamten Meßbereich mit steigender Kreatinkonzentration im Untersuchungsmaterial zu.

I. Wäßrige Lösungen (wie Urine behandelt)

$$c = \Delta E \quad 2,296 \quad \text{mmol/l}$$

$$c = \Delta E \quad 30,108 \quad \text{mg/100 ml}$$

Zugefügtes Kreatin		Wiederfindung			
mmol/l	mg/100 ml	ΔE	mmol/l	mg/100 ml	R %
0,000	0,00	0.000	0,000 ¹⁾	0,00	± 0
0,080	1,05	0.035	0,080	1,05	± 0
0,160	2,10	0.070	0,161	2,11	+ 0,6
0,240	3,15	0.104	0,239	3,13	- 0,4
0,320	4,20	0.138	0,317	4,15	- 0,9
0,400	5,25	0.174	0,400	5,25	± 0
0,800	10,49	0.350	0,804	10,54	+ 0,5
1,200	15,74	0.524	1,203	15,78	+ 0,3
1,600	20,98	0.695	1,596	20,93	- 0,3
2,000	26,23	0.871	2,000	26,22	± 0
2,400	31,47	1.026 ²⁾	2,356	30,89	- 1,8

Tab. 3.12

Auch bei den wäßrigen Kreatin-Lösungen wird ein geringfügiger "Schleich" von $\Delta E = 0.006$ pro 10 min beobachtet.

- 1) Rundet man die Werte auf 2 Stellen hinter dem Komma, dann werden die Abweichungen vom Sollwert -mit Ausnahme der höchsten Kreatinkonzentration- gleich Null
- 2) Durch Umschalten des Meßbereichs ermittelter Wert

II. Aufgestocktes Serum

Zugefügtes Kreatin		Wiederfindung				
mmol/l	mg/100ml	ΔE_G	$\Delta E_G - \Delta E_S$	mmol/l	mg/100ml	R %
0,000	0,00	0.033	ΔE_S	0,045	0,60	
0,032	0,42	0.056	0.023	0,032	0,42	± 0
0,064	0,84	0.047	0.047	0,065	0,85	+ 1,6
0,096	1,26	0.103	0.070	0,096	1,26	± 0
0,128	1,68	0.127	0.094	0,130	1,70	+ 1,6
0,160	2,10	0.150	0.117	0,161	2,11	+ 0,6
0,192	2,52	0.171	0.138	0,190	2,49	- 1,0
0,224	2,94	0.192	0.159	0,219	2,87	- 2,2
0,256	3,36	0.219	0.186	0,256	3,36	± 0
0,288	3,78	0.242	0.209	0,288	3,78	± 0
0,320	4,20	0.265	0.232	0,320	4,19	± 0
0,352	4,62	0.290	0.257	0,354	4,64	+ 0,6
0,384	5,04	0.311	0.278	0,383	5,02	- 0,3
0,448	5,88	0.354	0.321	0.442	5,80	- 1,4
0,512	6,71	0.405	0.372	0.513	6,72	+ 0,2
0,000	0,00	0.039	ΔE_S	0,054	0,70	
0,576	7,55	0.453	0.414	0,570	7,48	- 1,0
0,640	8,39	0.507	0.468	0,645	8,45	+ 0,8
0,800	10,49	0.622	0.583	0,803	10,53	+ 0,4
1,220	16,00	0.902	0.863	1,189	15,59	- 2,5

Tab. 3.13

Auch bei Serumuntersuchungen ist die Linearität gewahrt. Pathologische Werte für Kreatin im Serum wurden bis etwa 4 mg/100 ml beobachtet.

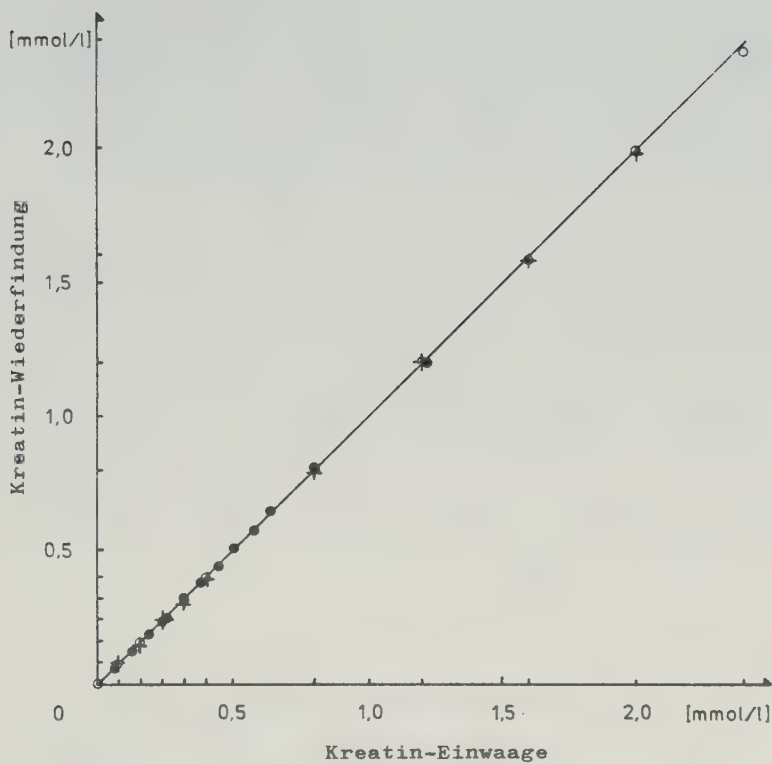


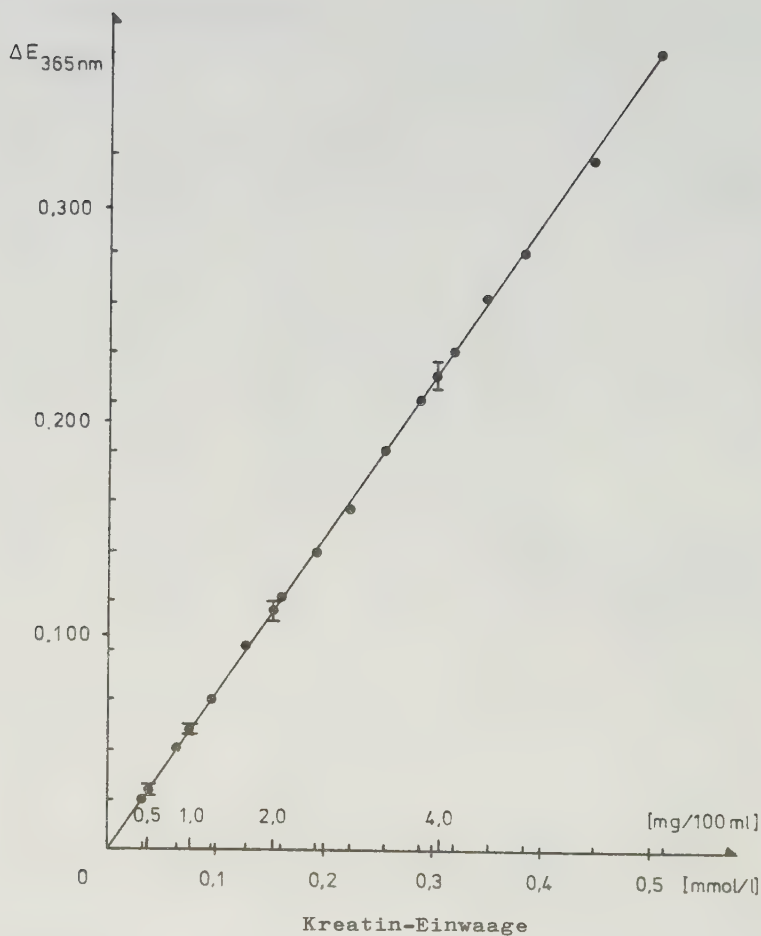
Abb. 3.14

Wiederfindung von zugesetztem Kreatin zu:

○ wäßriger Lösung

● Pool-Serum

+ Urin



III. Verdünnungen der Probe

Seren können mit destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalz-Lösung verdünnt werden. Das Verdünnungsverhältnis ist aber bei der Enteiweißung zu berücksichtigen. Die im Versuch ermittelten prozentualen Abweichungen vom Erwartungswert liegen im Bereich der Unpräzision der Methode.

Verdünnung		Kreatin im Serum				
Faktor	Serum ml	Erwartung		Wiederfindung		R %
		mmol/l	mg/100 ml	mmol/l	mg/100 ml	
1,0	0,250			0,352	4,62	
0,8	0,200	0,282	3,70	0,280	3,67	- 0,7
0,6	0,150	0,211	2,77	0,212	2,78	+ 0,5
0,4	0,100	0,141	1,85	0,142	1,86	+ 0,7
0,2	0,050	0,070	0,92	0,070	0,92	± 0

Tab. 3.14

3.2.5.14. Einfluß verschiedener Stoffe auf das Testsystem

Es wurde der Einfluß verschiedener Stoffe, die im Test bzw. Serum vorkommen, auf die enzymatische Kreatinbestimmung untersucht. Aufgezeigt werden die Ergebnisse mit verschiedenen Serumkonzentrationen von Glycocyamin, Kreatinphosphat, Kreatinin, Pyruvat und Lactat. Von besonderem Interesse ist das Glycocyamin, da es ebenfalls mit der Creatin-Kinase reagiert. Die mit Guanidinoessigsäure als Substrat erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit soll aber nur 1/40 der von Kreatin betragen (BERGMEYER 1974). Die Stoffe wurden in den Massenkonzentrationen von 0, 0,5, 1,0, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 7,5, 10,0 und 20,0 mg/100 ml zu Serum zugesetzt. Nur Lactat bildete eine Ausnahme, hier wurden 0, 5, 10, 15, 20, 40, 80, 120, 160, 240, 320 und 400 mg/100 ml Serum verwendet.

I. Glycocyamin (= Guanidinoessigsäure, Mol.-Gew. 117,1)

Glycocyamin reinst, Serva Feinbiochemica Heidelberg

Der Normalbereich (95%) für Glycocyamin im Serum wird mit 0,24 - 0,44 mg/100 ml angegeben. Erythrozyten sollen kein Glycocyamin enthalten (GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen 1977). Die Aufstockungsversuche bei Serum ergaben bis zu einer Glycocyaminkonzentration von 20 mg/100 ml keine Abweichungen bei der Wiederfindung von Kreatin. Die beobachteten Fehler lagen in der Größenordnung der Unpräzision der Methode. Mit steigender Glycocyaminkonzentration nahm allerdings die Extinktionsabnahme/Zeiteinheit des inkonstanten Endwerts zu. An diesem "Schleich" ist die Anwesenheit von höheren Konzentrationen der Guanidinoessigsäure im Testsystem leicht zu erkennen. Er kann bei einer Serum-Glycocyaminkonzentration von 20 mg/100 ml etwa $\Delta E/\Delta t \approx 0.010/\text{min}$ betragen. Eine Störung der Kreatinbestimmung ist nicht gegeben, da durch Extrapolieren die Extinktionsdifferenz zum Zeitpunkt t_0 ermittelt wird. Versucht man eine reine wäßrige Glycocyamin-Lösung (10 mg/100 ml) mit dem Analysensystem zu bestimmen, so erhält man erwartungsgemäß -nach dem Start der Meßreaktion mit CK- einen linearen Extinktionsabfall ohne Anlaufphase (hier: $\Delta E/\Delta t = 0.004/\text{min}$).

II. Kreatinphosphat (Mol.-Gew. 211,1)

Creatinphosphat, kristallisiertes Dinatriumsalz,
BOEHRINGER MANNHEIM 126 977

Kreatinphosphat ist eine labile Verbindung, die außerhalb des Körpers schon nach 20 min vollständig in Phosphorsäure und Kreatin zerfällt. Normales Menschenblut soll kein Kreatinphosphat enthalten (GUGGENHEIM 1951). Im Testsystem wird aus Kreatin und ATP Kreatinphosphat gebildet; es sollte deshalb auch der Einfluß von -dem Serum zugesetzten- Kreatinphosphat geprüft werden. Selbst bei der höchsten verwendeten Serum-Kreatinphosphatkonzentration von 20 mg/100 ml wurden keine Auswirkungen auf das Testergebnis beobachtet.

III. Kreatinin (= 1-Methylglycocyamidin, Mol.-Gew. 113,12)

Kreatinin, MERCK 5208

Serum-Kreatininkonzentrationen bis 20 mg/100 ml, die nur in Extremfällen (Nierenversagen) zu erwarten sind, haben keinen Einfluß auf die enzymatische Kreatinbestimmung. (siehe auch 4.2.1.)

IV. Pyruvat (= Brenztraubensäure, Mol.-Gew. 88,06)

Pyruvat, kristallisiertes Mononatriumsalz,
BOEHRINGER MANNHEIM 127 400

Die Normalwerte für Pyruvat im Serum liegen für Erwachsene zwischen 0,26 und 1,02 mg/100 ml. Erhöhte Werte werden nach Glucoseeinnahme, bei Muskularbeit und psychischer Erregung beobachtet. Pathologisch erhöhte Pyruvatkonzentrationen im Blut findet man bei Vitamin-B₁-Mangel, respiratorischer Alkalose, schweren kardiovaskulären Störungen, bei Arsen- und Quecksilbervergiftungen sowie bei Lebererkrankungen (GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen 1977).

Man kann die Testreaktionen zur enzymatischen Kreatinbestimmung auch in Teilschritten ablaufen lassen; d.h., man gibt nacheinander LDH, PK und CK zum Testsystem und zeichnet jedesmal den Reaktionsverlauf auf. Es lassen sich dann mit der LDH-Reaktion Extinktionsänderungen finden, die durch die Anwesenheit von Pyruvat in der Küvette verursacht werden. Pyruvat kann dabei aus dem Serum selbst stammen, aber auch mit dem Phosphoenolpyruvat in den Testansatz gelangt sein. PEP darf deshalb nicht zuviel Pyruvat enthalten. Steigert man die Konzentration von Brenztraubensäure im Serum, dann wird in der Vorreaktion auch mehr NADH verbraucht und die Ausgangsextinktion für die Kreatinbestimmung nimmt immer weiter ab. Bei einer Pyruvatkonzentration im Serum von 20 mg/100 ml werden etwa 95% des im Test vorhandenen NADH verbraucht. Abgesehen von der verminderten Ausgangsextinktion, stört die Anwesenheit von Brenztraubensäure in der Küvette die enzymatische Kreatinbestimmung nicht.

Auch bei einer Serum-Pyruvatkonzentration von 17 mg/100 ml ließen sich bei Wiederfindungsversuchen Kreatinkonzentrationen bis 3,0 mg/100 ml quantitativ bestimmen. In den Fällen, in denen vor der Kreatinbestimmung zuviel NADH verbraucht wird, kann man vor der CK-Zugabe dem Testsystem noch etwas NADH-Lösung zusetzen.

Wie schon beschrieben, wurden vielfältige Versuche unternommen, um das Serum-Pyruvat vor der Kreatinbestimmung aus dem Testansatz zu eliminieren. In Anlehnung an KIBRICK und MILHORAT (siehe 3.2.2.) wurde das Serum vor der Enteiweißung mit unterschiedlichen Volumina der Jod-Kaliumjodid-Lösung versetzt. Die anschließenden Pyruvat- und Kreatinbestimmungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen dem vorgeschlagenen Verfahren und der zusätzlichen Behandlung mit Jod-Kaliumjodid-Lösung.

V. Lactat (= Milchsäure, Mol.-Gew. 90,08)

L-Lactat-Standard-Lösung, 1,0 N

BOEHRINGER MANNHEIM 125 440

Lactat wird üblicherweise im Vollblut bestimmt, die Normalwerte betragen 6 - 17 mg/100 ml (PRELLWITZ 1976). Die Milchsäurekonzentration des Blutes ist bei Muskelarbeit und psychischer Erregung erhöht. Bei Lactatazidose und im Schock können Konzentrationen von mehr als 70 mg/100 ml Serum beobachtet werden (PRELLWITZ 1976). An der hiesigen Klinik (Intensivstation) wurden bei Patienten mit Lactatazidose sogar Werte bis 300 mg/100 ml Vollblut gemessen. Der Einfluß steigender Serum-Lactatkonzentrationen auf das Testsystem wurde deshalb bis 400 mg/100 ml verfolgt. Es ergaben sich keine Störungen bei der Kreatinbestimmung.

3.2.5.15. Hämolytisches Serum

Erythrozyten enthalten normalerweise höhere Konzentrationen Kreatin als das umgebende Plasma, wobei der mittlere Kreatingehalt der Erythrozyten mit zunehmendem Alter der roten Blutzellen abnimmt. Der Erythrozyten-Kreatingehalt stellt daher ein empfindliches Maß für das mittlere Alter der zirkulierenden Erythrozyten dar. Normalwerte, gemessen mit der auf den TECHNICON AutoAnalyser adaptierten Diacetyl-Naphthol-Reaktion, betragen $4,8 \pm 1,8$ (SD) mg/100 ml Erythrozyten (FEHR und KNOB 1977). Die Zellmembran der roten Blutkörperchen scheint aber in hohem Maße impermeabel für Kreatin zu sein und den freien Austausch mit dem Plasma zu verhindern. Mit radioaktiv markiertem Plasma-Kreatin konnte jedoch ein aktiver Transport in die Zellen nachgewiesen werden (SYLLM-RAPOPORT, DUMDEY and RAPOPORT 1977). Es wurde deshalb der Einfluß der Hämolyse auf die hier beschriebene enzymatische Kreatinbestimmung mit Hilfe von 3 Hämolyse-Reihen geprüft. Die Abbildung 3.16 zeigt, daß erst bei einer Hämoglobinkonzentration von mehr als 500 mg/100 ml Serum ein mäßiger Kreatinanstieg im Serum beobachtet wird. Eine so weitgehende Hämolyse läßt sich durch die tiefroten Färbung des Serums leicht erkennen; sie wird im allgemeinen bei hämolytischen Seren nicht erreicht. Eine geringgradige Hämolyse verfälscht deshalb das Testergebnis nicht. Trotzdem wurden zur Ermittlung der Normwerte für Kreatin im Serum nur sichtbar hämolysefreie Seren herangezogen (freies Hämoglobin < 100 mg/100ml).

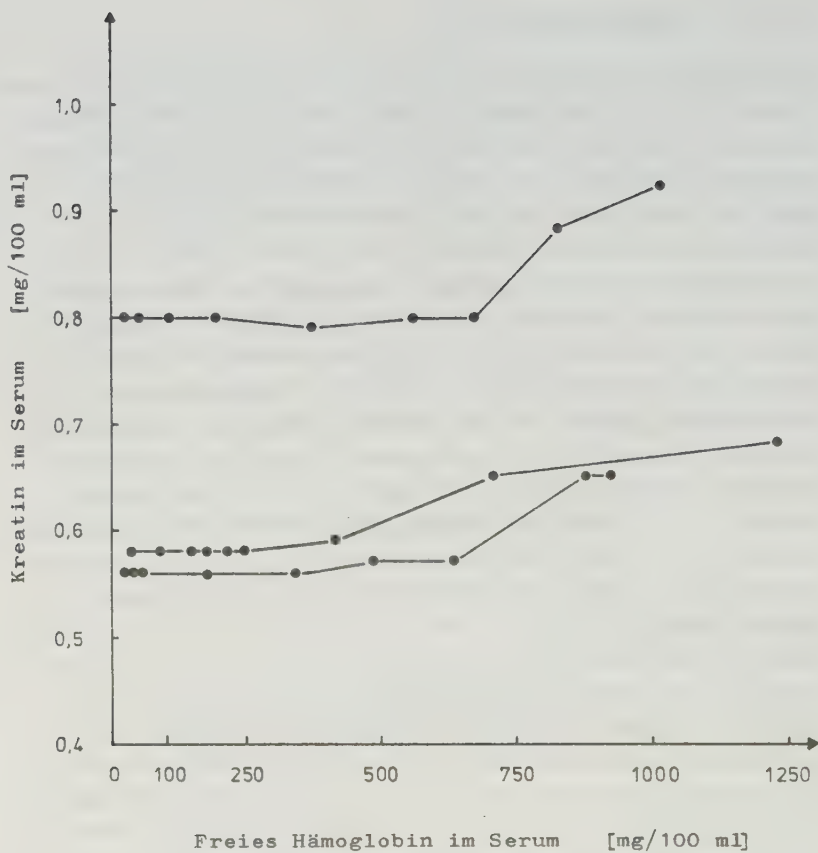


Abb. 3.16

Der Einfluß der Hämolyse auf die Kreatinkonzentration im Serum, gemessen an 3 verschiedenen Seren. Als Maß für den Hämolysegrad dient die Konzentration des freien Hämoglobins im Serum.

3.3. Nichtenzymatische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin im Urin

3.3.1. Photometrische Bestimmung von Kreatin als Kreatinin nach vorangegangener Zyklisierung im sauren Milieu in der Wärme

Das Prinzip dieser Methode, die viele Untersucher in vielfältiger Weise veränderten, basiert auf der Arbeit von Otto FOLIN, die im Jahre 1904 veröffentlicht wurde. Da bis dahin weder das Vorhandensein noch das Nichtvorhandensein des Kreatins in normalem Menschenharn erwiesen war, versuchte FOLIN die Bestimmung des Kreatins auf indirektem Weg mit Hilfe der Jaffé-Reaktion. Hierzu wurden 10 ml Harn mit 5 ml 1 mol/l Salzsäure auf dem Wasserbad ($\sim 90^{\circ}\text{C}$) für 3 Stunden erhitzt. Es fand dabei eine Umwandlung von Kreatin zu Kreatinin statt. Die Kreatinkonzentration des Harns ermittelt sich rechnerisch aus der Differenz von nach der Zyklisierung erhaltenem Gesamtkreatinin und präformiertem Kreatinin (Korrekturfaktor: 1,159; zur Kreatininbestimmung siehe 4.1.2.). Da mit dieser Methode nicht selten weniger Gesamtkreatinin als präformiertes Kreatinin gefunden wurde, schlugen BARKAN und HAHN 1920 ein 24stündiges Inkubieren des Urins bei 60°C in saurer Lösung vor (RAAFLAUB und ABELIN 1950). Auch ein Eindampfen der Proben vor der Analyse und während der Zyklisierung mit Salzsäure wurde empfohlen (DUNICZ 1964) sowie ein Zyklisieren durch 40minütiges Kochen mit Pikrinsäure (MACK and MONTGOMERY 1973). Durch Behandlung der Proben mit Jod-Kaliumjodid-Lösung und/oder Ausschütteln mit Äther sollten Substanzen mit störendem Einfluß auf die Jaffé-Reaktion eliminiert werden (TAUSSKY 1956). Da Kreatinin im allgemeinen in wesentlich höheren Konzentrationen im Harn vorkommt als Kreatin, erscheint die Pikratmethode zur quantitativen Bestimmung von nur geringen Mengen Harn-Kreatin wenig geeignet. Zudem ist sie keineswegs spezifisch für Kreatinin. Zusätzliche Fehler können durch Zerstörung von Kreatinin beim Erhitzen, Bil-

dung von unspezifischen Chromogenen und unvollständige Umwandlung von Kreatin in Kreatinin (Gleichgewichtsbildung) auftreten (LAUBER 1966).

Es wurde auch versucht die Nichtkreatininchromogene auf chromatographischem Wege vor der Bestimmung von Kreatin und Kreatinin abzutrennen (LOEFFLER 1964 a und 1964 b). Harnproben werden dazu einer eindimensional aufsteigenden Dünnschichtchromatographie unterzogen. Das Lösungsmittel besteht aus einem Gemisch von n-Propanol, Methanol und destilliertem Wasser; die Laufzeit beträgt 4 - 4,5 Stunden. Die entwickelte Platte wird an der Luft getrocknet, 2 Stunden bei 130 °C im Trockenschrank belassen, mit Pikrinsäure besprüht und weitere 10 Minuten im Trockenschrank (+ 110 °C) getrocknet. Nach dem anschließenden Besprühen mit 10%iger Natronlauge ergibt sich eine orangefarbene Farbentwicklung. Die durch präformiertes Kreatinin verursachten Farbflecken liegen näher an der Laufmittelfront als die durch Kreatin verursachten (R_f Kreatinin > R_f Kreatin). Zur quantitativen Kreatinbestimmung müssen die Urinproben jeweils doppelt aufgetragen werden. Durch teilweises Abdecken der Platte beim Besprühen kann man erreichen, daß sich nur ein Teil des Doppelansatzes anfärbt. Nach dem Sichtbarwerden der Substanzflecken werden die korrespondierenden ungefärbten Stellen des Kieselgels sorgfältig abgekratzt, mehrmals eluiert und mit alkalischer Pikrat-Lösung versetzt. Die Auswertung kann photometrisch erfolgen. Eine Korrektur der Kreatinkonzentration über die Molekulargewichte wurde von LOEFFLER nicht vorgenommen. Im Vergleich mit der einfachen Pikratmethode fanden sich mit der beschriebenen Technik durchschnittlich 15 % weniger Kreatinin aber 22 % mehr Kreatin (LOEFFLER 1964 a). Diese Methode wurde bei eigenen Versuchen zum Überprüfen der chromatographischen Reinheit des Kreatin-Standards verwendet; für Routineuntersuchungen war sie ungeeignet.

3.3.2. Photometrische Bestimmung von Kreatin mit

Hilfe der Diacetyl-Reaktion

Die photometrische Bestimmung von Kreatin mit Hilfe der Diacetyl-Reaktion (BARRITT-Reaktion) beruht auf der Bildung eines roten Farbstoffes durch Reaktion der Guanidino-Gruppe des Kreatins mit Diacetyl (2,3-Butandion) und α -Naphthol in alkalischer Lösung. Die Methode wurde 1943 von EGGLETON, ELSDEN und GOUGH ausgearbeitet. Für die Bestimmung von Harn-Kreatin kam sie aber erst seit 1950 zur Anwendung (RAAFLAUB und ABELIN 1950; FRICK 1954). Es zeigte sich jedoch, daß während des Reaktionsablaufs ständig Kreatin aus Kreatinin gebildet wird. Dies führt zu einer allmählichen Extinktionszunahme, wobei die Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin um so schneller erfolgt, je alkalischer das Milieu ist. Eine Verbesserung der Methodik gelang KANIG (1957) durch Herabsetzung der NaOH-Konzentration und Veränderung der Ablesezeiten am Photometer. Im Harn vorkommende Substanzen mit hemmendem oder förderndem Einfluß auf die Farbentwicklung werden durch einen Wiederfindungsversuch - von dem Harn zugesetzten Kreatin - rechnerisch berücksichtigt ("Innerer Standard"). Die Vortäuschung einer Kreatin-Ausscheidung von mehreren Milligramm pro Tag (bis über 30 mg/d) durch Substanzen mit Guanidino-Gruppe ist aber weiterhin möglich. Was die Spezifität anbetrifft, bietet also die Diacetyl-Reaktion gegenüber der indirekten Kreatinbestimmung (Jaffé-Reaktion) keinen wesentlichen Vorteil (KANIG 1957). Die von BERNHARDT benutzte Analysentechnik folgt den Angaben von KANIG (BERNHARDT 1977). Eine weitere Variante der Diacetyl-Methode wurde von LAUBER (1965) vorgeschlagen. Hier soll durch eine zweite Extinktionsmessung nach 29 statt nach 30 min, der um durchschnittlich 1 Minute verzögerte Start der Farbreaktion beim Kreatinin kompensiert werden: $E_{\text{korr}} = E_{15} - (E_{29} - E_{15})$ (LAUBER 1965). Die interessanteste Anwendung der Diacetyl-Reaktion stellt ihre Adaptation an die AutoAnalyzer-Technik dar (GRIFFITHS 1964). Durch Senkung der Reaktionstemperatur am AutoAnalyzer auf $+ 7,5^{\circ}\text{C}$ kann der Störfaktor der stetig erfolgenden Neubildung von Kreatin aus Kreatinin fast gänzlich ausgeschaltet werden (Gundlach et al. 1968).

3.4. Enzymatische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Kreatin im Urin

3.4.1 Bisher gebräuchliche Methoden zur enzymatischen Bestimmung von Kreatin im Urin

Die bisher beschriebenen Methoden zur enzymatischen Kreatinbestimmung im Urin unterscheiden sich in wesentlich geringerem Maße voneinander, als dies bei den entsprechenden Methoden zur Serumuntersuchung der Fall ist. Dies liegt in erster Linie daran, daß eine Enteiweißung der Harnproben entfällt. Alle Verfahren liefern gute Ergebnisse und sind den nichtenzymatischen Methoden bezüglich ihrer Empfindlichkeit und Spezifität weit überlegen.

Das erste Verfahren zur enzymatischen Bestimmung von Harn-Kreatin stammt von TANZER und GILVARG (1959). Die beiden Autoren ließen 24-Stunden-Urine unter Zusatz von Toluol sammeln, um ein Bakterienwachstum zu verhindern. Der zentrifugierte Harn wird mit 18 mol/l Kalilauge (KOH) auf pH = 9 eingestellt. Das im Test verwendete Harnvolumen beträgt 0,100 ml, das Endvolumen in der Küvette 1,000 ml. Die sonstigen Testbedingungen entsprechen den Angaben für die Serumuntersuchung (3.2.1.).

Eine Abänderung dieses Verfahrens von TANZER und GILVARG wurde 1965 von KIBRICK publiziert. Aber auch bei seiner Methode muß der Harn mittels eines pH-Meters mit 0,5 mol/l Natronlauge (NaOH) exakt auf pH = 9,0 eingestellt werden. Eine Weiterverdünnung der Urinprobe mit destilliertem Wasser - zur Erlangung eines brauchbaren Ausgangsvolumens - ist ebenfalls erforderlich. Von dem so verdünnten Harn werden 0,200 ml in den Test eingesetzt, bei einem Endvolumen in der Küvette von 3,310 ml. Die Berechnung der Kreatinkonzentration im Urin erfolgt über einen mitgeführten Standard (siehe auch 3.2.2.). Die Herstellung der Lösungen unterscheidet sich allerdings von der Vorschrift zur Serum-Kreatinbestimmung. Für die gleichzeitige Serum- und Urinuntersuchung werden deshalb verschiedene Ansätze benötigt.

Eine wesentliche Vereinfachung der Kreatinbestimmung im Urin brachte die Methode von BERNT, BERGMAYER und MÖLLERING (1974). Hier wird der filtrierte Harn nur noch zu gleichen Teilen mit 0,25 mol/l Glycin-Puffer (pH = 9) gemischt und davon 2 ml in den Bestimmungsansatz eingesetzt. Alle anderen Testbedingungen entsprechen genau der Vorschrift für die Kreatinbestimmung im Serum (siehe 3.2.4.). Das Endvolumen in der Küvette beträgt ebenfalls 2,320 ml.

Eine fluorimetrische kinetische Methode zur Kreatinbestimmung im Urin wurde im Jahre 1974 von LAU und GUILBAULT beschrieben. Im Gegensatz zu den anderen enzymatischen Verfahren wird hier nicht die Extinktionsänderung sondern die Abnahme der Fluoreszenz von NADH bei 460 nm mit einem Aminco Filter-Fluorimeter gemessen. Dabei ist die Fluoreszenzänderung der Kreatinkonzentration im Ansatz proportional. Die Methode zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität als vergleichbare absorptionsphotometrische Verfahren aus. Da Urin normalerweise eine beträchtliche Eigenfluoreszenz zeigt, müssen die fluoreszierenden Substanzen vor der Messung mit Aktivkohle entfernt werden. Versuche ergaben, daß das zu verschiedenen Urinen zugesetzte Kreatin auch in unterschiedlichem Maße wiedergefunden wird. Eine Verwendung von Standard-Kurven verbietet sich deshalb. Vielmehr muß jede Harnprobe in einer Doppelbestimmung analysiert werden, wobei einer der Proben ein Standard von 0,5 mg Kreatin/Ansatz zugefügt wird ("Innerer Standard"). Die Berechnung erfolgt nach der Gleichung:

$$c_{\text{Probe}} = 5 \cdot \frac{(\Delta F_{\text{Probe}} - \Delta F_{\text{Reagenzienleerwert}})}{(\Delta F_{\text{Standard}} - \Delta F_{\text{Probe}})} \quad \text{mg/100ml}$$

ΔF bedeutet dabei die initiale Änderung der Fluoreszenz pro 3 min.

3.4.2. Eine neue einfache Methode zur enzymatischen Kreatinbestimmung (Halbmikromethode)

Das neue, für die enzymatische Kreatinbestimmung im Serum entwickelte Verfahren ist gleichermaßen zur Bestimmung von Harn-Kreatin geeignet. Dabei erweist es sich als besonders vorteilhaft, daß die Testbedingungen weitgehend den Angaben in den Kapiteln 3.2.5.4. bis 3.2.5.8. entsprechen. Somit können alle Konzentrationen im Test gleichbleiben und es ist möglich mit nur einem Ansatz sowohl Serum- wie auch Urinuntersuchungen nebeneinander durchzuführen. Die Herstellung der Gebrauchs-Lösungen wurde schon beschrieben (3.2.5.8.). Im folgenden wird auf die Besonderheiten der Harnuntersuchung eingegangen.

3.4.2.1. Durchführung des Tests

Die Durchführung der enzymatischen Kreatinbestimmung im Urin gleicht im wesentlichen der Bestimmung des Serum-Kreatins. Es wird deshalb auch auf die Ausführungen in den Kapiteln 3.2.5.9. und 3.2.5.10. verwiesen. Eine Ent-eiweißung der Urinproben ist nicht notwendig. Hingegen erweist sich die Abtrennung von Schleim und Sediment als erforderlich. Hierzu zentrifugiert man etwa 1 ml des gut gemischten Harns für 1 min in der Tischzentrifuge. Insbesondere bei 24-Stunden-Sammelurinen ist auf eine gute Durchmischung zu achten. Nach dem Zentrifugieren muß die Harnprobe verdünnt werden. Entweder man mischt 1 Teil Urin mit 4 Teilen destilliertem Wasser und setzt 0,500 ml des Gemischs im Test ein, oder man pipettiert 0,100 ml unverdünnten Harn direkt in die mit 0,400 ml beschickte Halbmikroküvette. Zum Küvetteninhalt werden dann 0,250 ml vom Reagenzien-Mix (IV) und 0,020 ml von der NADH/PK/LDH-Lösung (V) zugemischt. Die Meß-Reaktion wird durch das Einmischen von 0,020 ml CK-Lösung (VI) gestartet. Die Bestimmung der Extinktionsänderung ΔE erfolgt an Hand des Schreiberprotokolls. Steht kein Kompensationsschreiber zur Verfügung, müssen die Extinktion direkt nach CK-Zugabe (E_1) sowie die Extinktionen nach 15 min (E_2) und 25 min (E_3)

abgelesen werden. Die wahre Extinktionsänderung ΔE läßt sich aus diesen Werten berechnen:

$$\Delta E = (E_1 - E_3) - 2,5 \cdot (E_2 - E_3)$$

Urine mit einer Kreatinkonzentration > 30 mg/100 ml müssen entsprechend verdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnung ist bei der Berechnung zu berücksichtigen.

Die Konzentrationen im Test sind der Tabelle 3.09 zu entnehmen, sie sind identisch mit den Werten für die Kreatinbestimmung im Serum. Statt 0,50 ml "Überstand nach Ent-eiweißung" sind lediglich 0,50 ml "verdünnter Urin" einzusetzen. Für die Kreatinbestimmung im Urin wird die Wahl des Bereichs $E = 0 - 1,000$ am Kompensationsschreiber empfohlen. Bei dieser Skalenspreizung lassen sich auch Urine mit höheren Kreatinkonzentrationen ohne Vorverdünnung erfassen.

3.4.2.2. Berechnung der Kreatinkonzentration im Urin

Die Berechnung der Kreatinkonzentration im Urin erfolgt mit Hilfe der folgenden Formeln. Die Verdünnung des Harns ist zu berücksichtigen.

$$c = \Delta E \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \quad \text{mmol/l Urin}$$

bzw.

$$c = \Delta E \cdot \frac{\text{MG}}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \quad \text{mg/l Urin}$$

$$F = \frac{\text{Volumen Urin} + \text{Volumen Wasser}}{\text{Volumen Urin}}$$

Im Test werden 0,100 ml Urin mit 0,400 ml destilliertem Wasser verdünnt:

$$F = \frac{0,100 + 0,400}{0,100} = 5$$

Für die Messung bei 365 nm gilt:

$$= 3,441 \cdot 10^{-1} \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$$

$$c = \Delta E \cdot \frac{1}{3,441 \cdot 10^{-1} \cdot 10} \cdot \frac{0,790}{0,500} \cdot 5 \quad \text{mmol/l Urin}$$

$$c = \Delta E \cdot 2,296 \quad \text{mmol/l Urin}$$

bzw.

$$c = \Delta E \cdot \frac{131,14}{3,441 \cdot 10^{-1} \cdot 10} \cdot \frac{0,790}{0,500} \cdot 5 \quad \text{mg/l Urin}$$

$$c = \Delta E \cdot 301,077 \quad \text{mg/l Urin}$$

oder

$$c = \Delta E \cdot 30,108 \quad \text{mg/100 ml Urin}$$

Kreatinkonzentration im Urin

λ	365 nm	334 nm ⁺	
c =	$\Delta E \cdot 2,296$	$\Delta E \cdot 1,278$	mmol/l
c =	$\Delta E \cdot 30,108$	$\Delta E \cdot 16,764$	mg/100 ml

$$^+ \epsilon_{334 \text{ nm}} = 6,18 \cdot 10^{-1} \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$$

3.4.2.3. Präzision und Richtigkeit

Für die tägliche Kontrolle der Präzision werden 2 Urine benutzt, mit Kreatinkonzentrationen im Normalbereich (N) und im pathologischen Bereich (P) (Tab. 3.15 und 3.16). Die Kreatinkonzentration des 2. Urins (P) liegt gerade so hoch, daß die Extinktionsänderungen noch im Bereich $E = 0 - 1.000$ aufgezeichnet werden können. Zur Bereitung der Präzisionskontrollen wurden die beiden Urine sorgfältig filtriert, in Portionen von je 0,250 ml in Eppendorf Reaktionsgefäßen abgefüllt und im Gefrierschrank bei $- 20^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Zugabe von Konservierungsstoffen erwies sich als nicht notwendig. Die eingefrorenen Urine sind etwa 2 Jahre haltbar. Ein Wiedereinfrieren von aufgetauten Proben ist aber zu vermeiden.

Die Richtigkeit der Kreatinbestimmung im Urin wird durch Zumischen von 0,020 ml wäßriger Kreatin-Lösung zu beliebigen Harnproben oder den Kontroll-Urinen überprüft (Tab. 3.16). Meist erfolgte die Richtigkeitskontrolle mit wäßrigen Kreatin-Lösungen von 5,25 mg/100 ml ($\hat{=}$ 1,05 mg Kreatin/100 ml Urin) und 50,00 mg/100 ml ($\hat{=}$ 10,00 mg Kreatin/100 ml Urin). Zur Herstellung der Kreatin-Standards siehe auch Kapitel 3.2.5.1. und 3.2.5.8. VII..

I. Präzision in der Serie

Kreatin	Urin N mg/100ml	Urin P mg/100ml
1	1,99	23,97
2	1,96	23,97
3	1,93	23,94
4	1,93	23,91
5	1,93	24,03
6	1,96	23,97
7	1,96	24,06
8	1,96	24,00
9	1,96	24,21
10	1,93	24,18
11	1,93	24,03
12	1,96	24,27
13	1,96	24,21
14	1,93	24,09
15	1,93	23,97
16	1,99	24,06
17	1,96	24,21
18	1,96	24,06
19	1,96	23,94
20	1,93	24,00

n = 20

$\bar{x}$	1,95	24,05
s	0,020	0,107
VK %	1,03	0,44
+ 3s	2,01	24,37
- 3s	1,89	23,73

Tab. 3.15

II. Präzision von Tag zu TagRichtigkeit

Kreatin	Urin N	Urin P	1,05	10,00
	mg/100ml	mg/100ml	mg/100ml	mg/100ml
1	1,90	24,21	1,08	10,13
2	1,96	23,76	1,02	10,19
3	1,93	23,63	1,05	9,85
4	2,02	24,27	1,05	10,06
5	1,99	23,66	1,08	9,91
6	1,93	23,66	1,05	9,88
7	1,99	24,42	1,05	10,03
8	1,96	23,91	1,05	9,88
9	1,96	23,79	1,05	10,00
10	1,96	23,97	1,05	9,94
11	1,90	23,94	1,05	10,16
12	1,99	24,33	1,05	10,03
13	1,96	24,39	1,08	10,22
14	1,99	23,94	1,05	10,19
15	1,93	23,88	1,02	9,88
16	1,99	24,33	1,05	9,75
17	1,96	23,91	1,05	10,13
18	1,96	23,66	1,05	9,97
19	1,93	24,24	1,05	9,75
20	1,99	24,42	1,05	9,85

n = 20

$\bar{x}$	1,96	24,02	1,05	9,99
s	0,032	0,282	0,015	0,147
VK %	1,63	1,17		
Wieder- findung			1,05	9,99
R %			100,0 %	99,9 %
			± 0	- 0,1
+ 3s	2,06	24,87		
- 3s	1,86	23,17		

Tab. 3.16

3.4.2.4. Linearität der Eichfunktion

Die Linearität der Eichfunktion für die enzymatische Kreatininbestimmung im Urin wird durch Wiederfindungsversuche mit aufgestockten Urinproben (I) und durch Verdünnung der Proben (II) geprüft. Sie ist in beiden Fällen gegeben. Die jeweils gemessenen Abweichungen vom Sollwert - hier ausgedrückt durch das Richtigkeitsmaß R (%) - liegen im Bereich der Unpräzision der Methode. Dies ist aus den Tabellen 3.17 und 3.18 sowie den Abbildungen 3.14 und 3.17 ersichtlich.

I. Aufgestockter Urin

Zugefügtes Kreatin		Wiederfindung					
mmol/l	mg/100ml	ΔE_G	$\Delta E_G - \Delta E_U$	mmol/l	mg/100ml	R %	
0,000	0,00	0.061	ΔE_U	0,140	1,83		
0,080	1,05	0.096	0.035	0,080	1,05	± 0	
0,160	2,10	0.130	0.069	0,158	2,08	- 1,3	
0,240	3,15	0.167	0.106	0,243	3,19	+ 1,3	
0,320	4,20	0.199	0.138	0,317	4,15	- 0,9	
0,400	5,25	0.234	0.173	0,397	5,21	- 0,8	
0,800	10,49	0.404	0.343	0,788	10,33	- 1,5	
1,200	15,49	0.585	0.524	1,203	15,78	+ 0,3	
1,600	20,98	0.755	0.694	1,593	20,89	- 0,4	
2,000	26,23	0.928	0.867	1,991	26,10	- 0,5	

Tab. 3.17

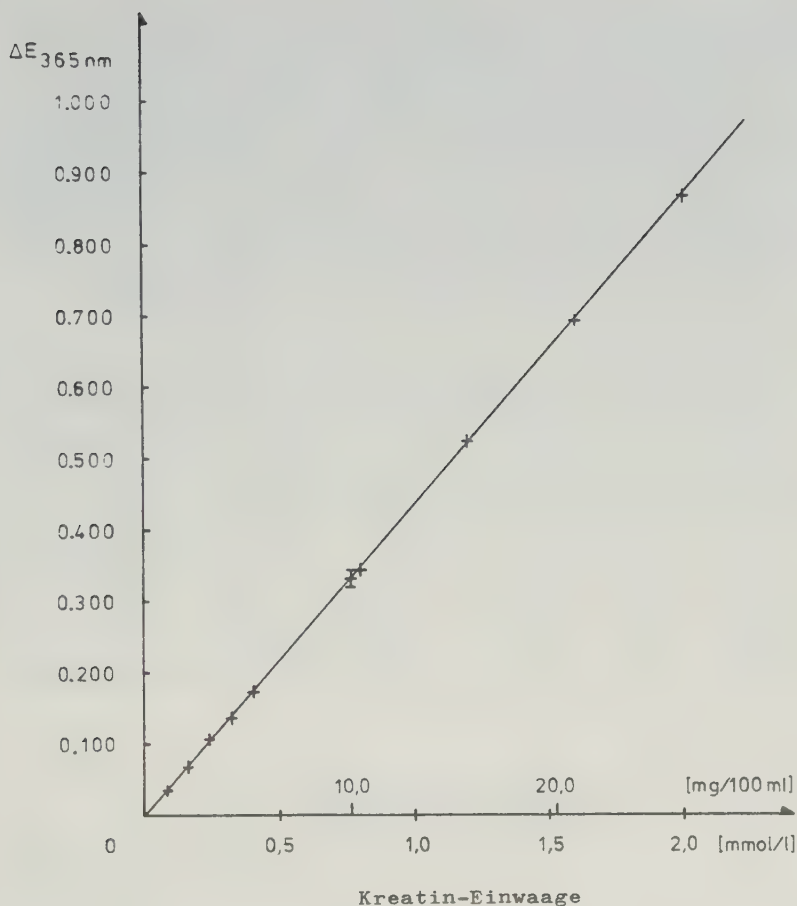


Abb. 3.17

ΔE_{365 nm} in Abhängigkeit von zugesetztem Kreatin zu Urin.

Für 10,0 mg Kreatin/100 ml Urin ist der Kontrollbereich ($\bar{x} \pm 3 s$) dargestellt.

II. Verdünnungen der Harnprobe

Urine mit besonders hohen Kreatinkonzentrationen - wie sie insbesondere bei Patienten mit Muskelerkrankungen zu beobachten sind - müssen vor der Analyse verdünnt werden. Dies erfolgt mit destilliertem Wasser. Der hierdurch bedingte zusätzliche Verdünnungsfaktor ist bei der Berechnung der Kreatinkonzentration zu berücksichtigen.

Verdünnung		Kreatin im Urin				
Faktor	Urin ml	Erwartung		Wiederfindung		R %
		mmol/l	mg/100 ml	mmol/l	mg/100 ml	
1,0	0,100			1,828	23,97	
0,8	0,080	1,462	19,18	1,474	19,33	+ 0,9
0,6	0,060	1,097	14,38	1,109	14,54	+ 1,1
0,4	0,040	0,731	9,59	0,735	9,63	+ 0,5
0,2	0,020	0,366	4,79	0,365	4,79	- 0,3
0,1	0,010	0,183	2,40	0,186	2,44	+ 1,6

Tab. 3.18

3.4.2.5. Haltbarkeit der Harnproben

Im Urin besteht die Möglichkeit der Umwandlung von Kreatinin zu Kreatin bei alkalischem pH. Diese Reaktion vollzieht sich teilweise bereits in der Harnblase und entzieht sich damit der direkten Messung (TANZER und GILVARG 1959). Harnproben müssen deshalb unverzüglich nach ihrer Gewinnung analysiert werden. Wenn dies nicht möglich ist, dann sollten die Urinproben bei -20°C im Gefrierschrank gelagert werden. Die Abbildung 3.18 zeigt, daß bei dieser Temperatur keine meßbare Neubildung von Kreatin stattfindet. Dagegen ist eine rasche Zunahme der Kreatinkonzentrationen bei Lagerung der Urinproben bei $+20^{\circ}\text{C}$ zu beobachten. Sie erfolgt auf Kosten von Kreatinin und ist abhängig von der Kreatininkonzentration des Harns. Bei nur geringen Kreatinkonzentrationen neben viel Kreatinin wird der relative Fehler durch das artifizielle Kreatin beson-

ders groß (Urin B). Die gleichzeitig auftretende, wesentlich stärkere Abnahme der Kreatininkonzentration im Harn ist allein mit der Neubildung von Kreatin nicht ausreichend zu erklären (Tab. 3.19). Da das Harn-Kreatinin nicht enzymatisch, sondern mit der relativ ungenauen Jaffé-Methode bestimmt wurde, könnten die Verluste meßtechnisch bedingt sein. Es wäre auch ein Abbau anderer Jaffé-positiver Substanzen im Urin denkbar, selbst bei -20°C .

Kreatin (K) und Kreatinin (Kn) im Urin (mmol/l)

Lagerung bei	-20°C		$+4^{\circ}\text{C}$		$+20^{\circ}\text{C}$	
	K	Kn	K	Kn	K	Kn
<u>Urin A</u>						
1. Tag	1,10	9,28	1,10	9,28	1,10	9,28
14. Tag	1,10	8,93	1,12	8,75	1,46	8,58
8. Monat	1,10	8,75	1,29	7,25	3,20	5,22
<u>Urin B</u>						
1. Tag	0,08	18,56	0,08	18,56	0,08	18,65
14. Tag	0,08	17,68	0,19	17,42	0,68	17,24
8. Monat	0,08	16,89	1,98	15,03	8,10	7,60

Tab. 3.19

Die Änderung der Kreatinkonzentration im Urin in Abhängigkeit von der Lagerungszeit bei 3 verschiedenen Lagerungstemperaturen.

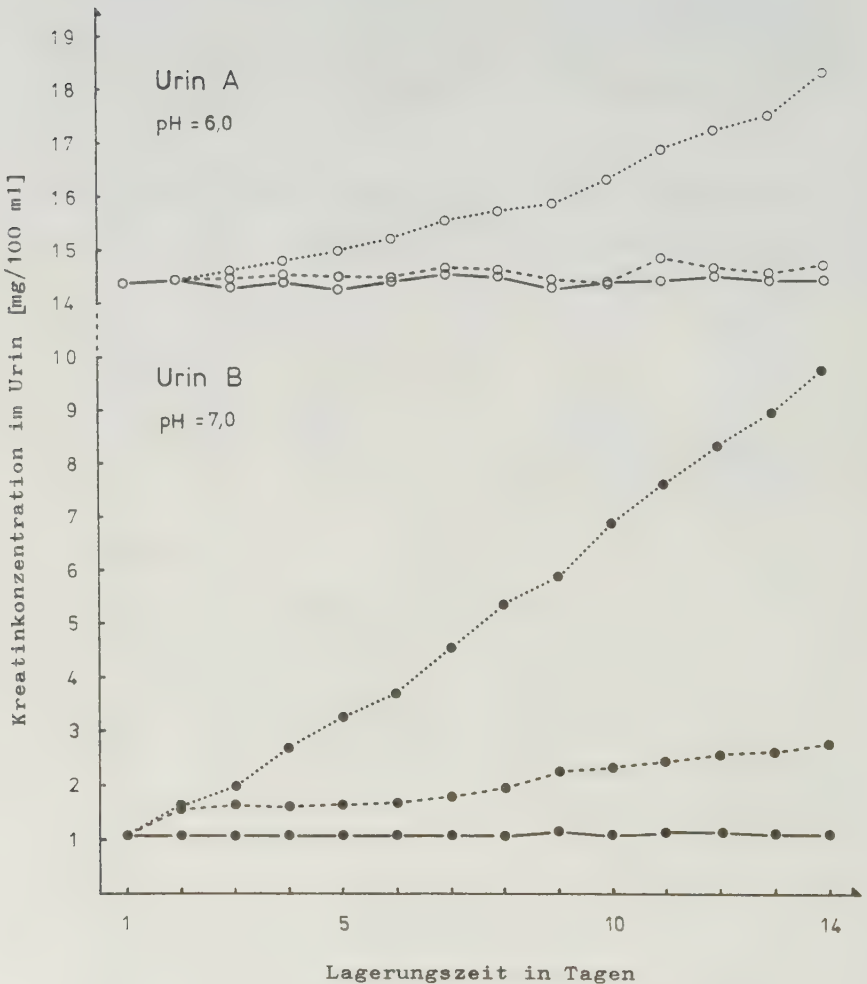


Abb. 3.18

- Lagerung bei - 20°C (Gefrierschrank)
- - - Lagerung bei + 4°C (Kühlschrank)
- Lagerung bei + 20°C (Raumtemperatur)

3.5. Ergebnisse der methodologischen Untersuchung zur enzymatischen Kreatininbestimmung

Die quantitative Bestimmung von Kreatinin im Serum und im Urin kann mit nichtenzymatischen und enzymatischen Methoden erfolgen. Die Jaffé-Reaktion und die Diacetyl-Reaktion sind Farb-Reaktionen, die in einer Vielzahl von Varianten weit verbreitet sind. Wie dargestellt wurde, sind beide Reaktionstypen unspezifisch und störanfällig (3.1. und 3.3.). Die nichtenzymatischen Methoden sollten deshalb heute für wissenschaftliche Untersuchungen nicht mehr benutzt werden.

Der Methodenvergleich zur enzymatischen Kreatininbestimmung im Serum erfolgte mit drei bisher bekannten und einem eigenen neuen Verfahren. An Hand von Serienuntersuchungen mit identischen Seren wurden die Präzision und die Richtigkeit der einzelnen Methoden festgestellt und die Praktikabilität der Testdurchführung aufgezeigt. Genaue Angaben zu den Bestimmungsverfahren sind in den Kapiteln 3.2. und 3.4. zu finden. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse zeigen die Tabellen 3.20 und 3.21.

Allen Methoden im Vergleich ist gemeinsam, daß sie das von TANZER und GILVARG (1959) beschriebene spezifische Reaktionsprinzip zur enzymatischen Kreatininbestimmung benutzen. Ebenso ist stets eine Enteiweißung der Serumproben notwendig. Bei zwei Verfahren werden die Serumproteine im stark sauren Bereich ausgefällt. Dies erfordert eine anschließende Extraktion der Säure mit Äther (nach BERLET, II) bzw. eine Neutralisation des sauren Zentrifugats (nach BERNT, BERGMAYER und MÖLLERING, III). Dagegen liefert die Enteiweißung mit den NELSON-SOMOGYI-Reagenzien nach dem Zentrifugieren einen fast alkalischen Überstand (nach KIBRICK und MILHORAT, I). Ein schwach sauer bis annähernd neutral reagierendes Zentrifugat wird durch die Eiweißfällung mit Uranylacetat-Lösung gewonnen (eigenes Verfahren, IV). In den beiden letztgenannten Fällen erübrigt sich daher eine Neutralisation des Überstands. Trotz

unterschiedlicher pH-Verhältnisse bei der Enteiweißung ergeben sich mit den Methoden III und IV identische Kreatinkonzentrationen für die untersuchten Seren. Die um durchschnittlich 5 % geringere Wiederfindung bei der Methode von KIBRICK und MILHORAT (I) könnte eventuell mit einer unspezifischen Adsorption von Kreatin an das Präzipitat zu erklären sein. Dieses Ergebnis entspricht den Angaben der beiden Autoren, die bei 20 Versuchen mit aufgestockten Seren nur eine mittlere Wiederfindung von 95,2 % erreichten. Mit der Methode von BERLET (II) werden die höchsten Werte für das Pool-Serum und die aufgestockten Pool-Seren gemessen. Dies ist wohl auf das unterschiedliche Verhalten der wäßrigen Standards und der Seren im Test zurückzuführen. Setzt man dagegen willkürlich die Pool-Seren als Standard - mit 0,63 mg Kreatin/100 ml Serum - in die Rechnung ein, dann beträgt die Wiederfindung durchschnittlich 90 % des zugesetzten Kreatins (Extinktionsablesung nach 20 min).

Hinsichtlich der Handhabung erweisen sich die Methoden II und III als recht aufwendig. Das Verfahren nach BERLET (II) verlangt dreimaliges Ausschütteln des eiweißfreien Überstands mit Äther. Dieses Vorgehen erscheint ungeeignet für Routineanalysen (Explosionsgefahr, großer Zeitaufwand). Bei der Methode von BERNT, BERGMAYER und MÖLLERING (III) sind das Neutralisieren des Zentrifugats, das Abfiltrieren im Eisbad und das anschließende Temperieren auf 25°C zeit- und arbeitsintensive Vorgänge. Die Behandlung im Eisbad darf aber nicht unterbleiben, da bei Erwärmung das ausgefällte Perchlorat wieder in Lösung gehen kann.

Mit den Methoden III und IV werden bezüglich Präzision und Richtigkeit der Kreatinbestimmung die besten Ergebnisse erzielt. Beide Verfahren bieten zudem den Vorteil, daß mit nur einem Reagenzien-Ansatz sowohl Serum- wie auch Urinuntersuchungen durchgeführt werden können. Eine Änderung der Testbedingungen ist hierzu nicht notwendig. Dies erweist sich für Routineuntersuchungen als besonders vorteilhaft.

Seit Abschluß des Methodenvergleichs zur Kreatininbestimmung wurden die weiteren Untersuchungen nur noch mit der neuentwickelten Halbmikromethode durchgeführt. Sie weist gegenüber den anderen enzymatischen Verfahren bezüglich Präzision, Richtigkeit und Handhabung keine Nachteile auf. Zudem ist sie für Kreatininbestimmungen im Serum und Urin gleichermaßen geeignet. Mit nur 0,250 ml Serum im Test wird bei einer minimalen Anzahl von Bearbeitungsschritten die kürzeste Zeit für eine Einzelbestimmung gemessen. Die Reagenzien-Zubereitungen sind zudem länger haltbar als dies für vergleichbare Lösungen bei anderen Verfahren angegeben wird. Die Intervalle, in denen frische Lösungen angesetzt werden müssen, können dadurch verlängert werden. Der Preis für eine Serumanalyse von nur 0,43 DM (= Kosten für die benötigten Reagenzien) rechtfertigt heute kaum mehr die Kreatininbestimmung mit weniger spezifischen Methoden.

Methodenvergleich "Zeit- und Arbeitsaufwand"

Kreatin im Serum	KIBRICK / MILHORAT	BERLET	BERNT / BERGMAYER MÖLLERING	EIGENE METHODE
	I	II	III	IV
Serum ml	3 •	3 •	4 •	0,250 •
Vorbehandeln min	5 •	-	-	-
Enteiweißen / Mischen min	10 • •	10 •	0,5 •	0,5 •
Zentrifugieren min	20	10	15	5
Ätherextraktion min	-	• 6 • • •	-	-
Neutralisieren / Filtrieren min	-	-	15 • •	-
Inkubieren / Vorlauf min	• 10-20 • •	• 10 • •	• • 10 • • •	• • 10 • •
CK-Zugabe / Extinktionsaufzeichnung min	20 •	20 •	35 •	25 •
Gesamtzeit min	65 - 75	56	75,5	40,5
Pipettierschritte	8	9	9	6

Jeder notwendige Pipettierschritt ist durch einen schwarzen Punkt • gekennzeichnet. Die Zeiten wurden den jeweiligen Autorenangaben entnommen.

Tab. 3.20

Methodenvergleich "Präzision und Richtigkeit"

Kreatin im Serum mg/100ml		KIBRICK / MILHORAT	BERLET	BERNT / BERGMAYER MÖLLERING	EIGENE METHODE
		I	II ⁺	III	IV
<u>Pool-Serum</u>	n	10	5	10	10
	$\bar{x}$	0,62	0,73	0,63	0,63
	s	0,022	0,055	0,023	0,009
Präzision	VK %	3,54	7,53	3,65	1,43
<u>Pool-Serum + 0,5 mg/100ml</u>	n	10	5	10	10
	$\bar{x}$	1,10	1,22	1,13	1,13
	s	0,029	0,127	0,028	0,016
Präzision	VK %	2,64	10,41	2,48	1,42
Wieder-		0,48	0,49	0,50	0,50
findung	%	96,0	98,0	100,0	100,0
Richtigkeit	R %	- 4,0	- 2,0	± 0	± 0
<u>Pool-Serum + 1,0 mg/100ml</u>	n	10	5	10	10
	$\bar{x}$	1,56	1,83	1,64	1,64
	s	0,042	0,175	0,018	0,009
Präzision	VK %	2,96	9,56	1,10	0,55
Wieder-		0,94	1,10	1,01	1,01
findung	%	94,0	110,0	101,0	101,0
Richtigkeit	R %	- 6,0	+10,0	+ 1,0	+ 1,0
<u>Pool-Serum + 2,0 mg/100ml</u>	n	10	5	10	10
	$\bar{x}$	2,51	2,74	2,64	2,64
	s	0,033	0,312	0,049	0,016
Präzision	VK %	1,31	11,39	1,86	0,61
Wieder-		1,89	2,01	2,01	2,01
findung	%	94,5	100,5	100,5	100,5
Richtigkeit	R %	- 5,5	+ 0,5	+ 0,5	+ 0,5

Tab. 3.21

⁺ Reaktionszeit 20 min, wäßrige Standards wie Seren behandelt

4. Probandenuntersuchungen

Mit Hilfe der neuen, hier vorgestellten enzymatischen Halbmikromethode zur Kreatinbestimmung sollen einige humanbiologisch und klinisch interessante Probleme behandelt werden. So wird erstmals mit einem enzymatischen Testverfahren eine größere Stichprobe untersucht, um Angaben über die Variationsbreite von Kreatin in Serum und Urin bei gesunden Probanden zu erhalten. Die bearbeitete Stichprobe umfaßt insgesamt 310 Personen, die im Studium bzw. Berufsleben stehen. Alle Probanden fühlten sich am Tag der Untersuchung subjektiv gesund. Die Teilnahme an den durchgeführten Tests war freiwillig und erfolgte unentgeltlich. In die statistische Aufarbeitung des Materials wurden aber nur Daten von solchen Probanden aufgenommen, die weder bei der anthropologischen Untersuchung auffällig waren, noch bei der anschließenden klinisch-chemischen Analyse von Serum und Urin pathologische Werte aufwiesen. Aus diesem Grund wurden auch Daten von Leistungssportlern aussortiert, für die sich deutlich außerhalb des Normbereichs liegende Enzymaktivitäten der Creatin-Kinase ergaben.

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen zur Gewinnung von Normwerten für Kreatin in Serum und Urin stellen eine Verbindung von Anthropometrie im herkömmlichen Sinne und "chemical anthropometry" (CORSA et al. 1950, nach BROŽEK 1965) dar.

4.1. Erfasste Merkmale

Die körperliche Untersuchung sowie die laborchemische Aufarbeitung von Serum und Urin wurde bei allen Probanden und Patienten nach dem gleichen Schema durchgeführt. Zur Aufzeichnung der individuellen Daten stand ein spezielles Untersuchungsblatt zur Verfügung, auf dem auch die Laborbefunde dokumentiert wurden (Abb. 4.01). Um eine leichte und sichere Übernahme der Daten auf jeweils drei Lochkarten pro Proband zu gewährleisten, ist das Untersuchungsblatt in drei Spalten gegliedert. Jede Spalte ist gesondert durch die Kartenart und die Kontrollnummer des Probanden gekennzeichnet.

WULF QUESER - ZENTRALLABOR DER MEDIZINISCHEN KLINIKEN UND ANTHROPOLOGISCHES INSTITUT - UNIVERSITÄT MAINZ

Serie	Halt		Seite		Kartendat	
	1	2	1	2	Kartenummer	1
Kartenummer	25		25		Kartenummer	25
Alter	67		68		Sexus	68
Gewicht	0		9-11		Kreatinin (mg %)	9-11
Untersuchungsumfeld	9-14		12-14		amorg. Phosphat (mg %)	12-14
Medikamente	15		15-17		Paracetamol (mg %)	15-17
Tag p. m.	18-17		18-20		Kreatinin (mg %)	18-20
Harnabgabe (ml)	18-21		21-23		SGOT (U/l)	21-23
Gewicht (kg)	22-25		24-26		SGPT (U/l)	24-27
Körperhöhe (mm)	26-29		27-29		Glucose (U/l)	26-30
Schulterbreite (mm)	30-32		30-33		AK (U/l)	31-34
Breitebreite (mm)	33-35		34-36		AP (U/l)	35-38
vert. Brustdurchmesser (mm)	36-38				7GT (U/l)	39-41
hög. Brustdurchmesser (mm)	39-41		40-42		Urea	42-45
Umfang	42-44		43-45		Kreatinin (mg %)	46-49
Unterarm links (mm)	45-47		46-48		amorg. Phosphat (mg %)	50-53
Unterarm rechts (mm)	48-50		49-51		Paracetamol (mg %)	54-58
Oberrarm links (mm)	51-53		52-54		Harnsäure (mg %)	59-62
Oberrarm rechts (mm)	54-56		55-57		pot	63-64
Unterarm links (mm)	57-59		58-60			
Unterarm rechts (mm)	60-62		61-63			
Biceps links (mm)	63-65					
Biceps rechts (mm)	66-68					
Triceps links (mm)	69-71					
Triceps rechts (mm)	72-74					
Radius links (mm)	75-77					
Radius rechts (mm)						
Ulna links (mm)						
Ulna rechts (mm)						
Rotationsindex						

□ GELOCHT

Abb. 4.01

Untersuchungsblatt (verkleinert)

Schlüssel für die Eintragungen in das Untersuchungsblatt

Kartenart 1

Kontrollnummer		vierstellig
Alter		Lebensalter in Jahren
Geschlecht		1 männlich 2 weiblich
Untersuchungsdatum		Tag Monat Jahr
Medikamente		0 keine Einnahme von Medikamenten
		1 regelmäßige Einnahme oraler Kontrazeptiva
		2 regelmäßige Einnahme von Medikamenten (vom Probanden näher anzugeben)
		3 regelmäßige Einnahme oraler Kontrazeptiva und weiterer zu beschreibender Medikamente
		4 regelmäßiger Alkoholkonsum
Tag p.m.		Tag post menstruum
		bei Frauen: gerechnet vom ersten Tag der vorausgegangenen Regelblutung an
		bei Männern: 00
Harnvolumen		Volumen des vormittäglichen Spontanurins bzw. des 24-Stunden-Sammelurins in ml
Gewicht	Nr. 71	Gewicht des nur mit Sporthose bzw. Unterwäsche bekleideten Probanden in kg (Präzisionswaage)
Körperhöhe	Nr. 1	vertikale Entfernung des Scheitels vom Boden in mm (Anthropometer)
Schulterbreite		geradlinige Distanz der beiden Akromien voneinander in mm (Großer Tasterzirkel)
	Nr. 35	
Beckenbreite	Nr. 40	(Cristalbreite) maximale geradlinige Distanz der beiden äußeren Darmbeinkämme voneinander in mm (Großer Tasterzirkel)

Vertikaler Nr. 36
Brustdurchmesser

(Transversaler Brustdurchmesser)
geradlinige Entfernung der beiden
am meisten seitlich ausgeladenen
Rippenpunkte in der Höhe des Mesos-
sternale voneinander in mm (in der
Mitte zwischen In- und Expiration
bei ruhigem Atmen)
(Großer Tasterzirkel)

Sagittaler Nr. 37
Brustdurchmesser

(Brusttiefe) geradlinige Entfer-
nung des Mesosternale von der in
der gleichen Horizontalebene ge-
legenen Dornfortsatzspitze der Brust-
wirbelsäule bei ruhiger Atmung in mm
(Großer Tasterzirkel)

Umfangsmaße

in mm (Stahlbandmaß)

Oberarmumfang
Nr. 65

größter Umfang des Oberarms bei
Streckung ohne Muskelkontraktion

Unterarmumfang
Nr. 66

größter Umfang des Unterarms bei
Streckung ohne Muskelkontraktion

Hautfaltenmaße

in mm (Harpenden Skinfold Caliper)

Biceps⁺

Hautfalte auf dem M. biceps, dem
Meßpunkt "Triceps" diametral ge-
genüber auf gleicher Höhe

Triceps⁺

Hautfalte auf dem M. triceps in
der Mitte der Verbindungslinie
zwischen der lateralen Kante des
Acromion und Olecranon

Radius⁺

Hautfalte auf dem Radius, dem Meß-
punkt "Ulna" diametral gegenüber
auf gleicher Höhe

Ulna⁺

Hautfalte auf der Ulna in der Mitte
zwischen dem Processus styloideus
ulnae und dem Olecranon

Kartenart 2

Kontrollnummer

vierstellig

Umfangsmaße

in mm (Stahlbandmaß)

das jeweils gemessene Bein wird entspannt

Oberschenkelumfang

Nr. 68

größter Umfang des Oberschenkels bei leicht gespreizten Beinen an der Stelle der stärksten medialen Ausladung der Muskulatur unterhalb der Nates

Unterschenkelumfang

größter Umfang des Unterschenkels (Wadenumfang, Stellung wie bei Nr. 68) an der Stelle der stärksten Ausladung der Wadenmuskulatur

Umfang des Abdomen

Nr. 62(1)

(Bauchumfang) horizontaler Umfang des Abdomen im Niveau des Umbilicus

Hautfaltenmaße

in mm (Harpenden Skinfold Caliper)

Oberschenkel

laterale Hautfalte parallel zur Längsachse des Oberschenkels, etwa 5 Finger breit unterhalb des Trochanter major

Unterschenkel⁺

laterale Hautfalte parallel zur Längsachse des Unterschenkels, etwa 5 Finger breit unterhalb des Caput fibulae

Abdomen⁺

horizontale Hautfalte etwa 4 Finger breit links vom Umbilicus

Suprailliacal⁺

längs zum Rumpf verlaufende Hautfalte in Höhe der Linie "Abdominalumfang" direkt oberhalb der Crista iliaca in der linken Axillarlinie

Subscapular ⁺	längs zum Rumpf verlaufende Hautfalte direkt unterhalb des Angulus inferior scapulae des linken Schulterblatts
Handumfang Nr. 67(2)	Umfang der locker ausgestreckten Hand um die weiteste Ausladung der Metacarpophalangealgelenke II und IV in mm (Stahlbandmaß)
Vigorimeterdruck	Messung der maximalen Handkraft mit zwei verschieden großen, birnenförmigen Gummibällen ohne Zuhilfenahme des Daumens in kPa (Martin Vigorimeter)
Rohrer-Index	Index der Körperfülle $\frac{\text{Körpergewicht (kg)} \times 100\,000}{\text{Körpergröße}^3 (\text{cm})^3}$

Die statistische Aufarbeitung des Datenmaterials erfolgte mit Hilfe der Großrechenanlage (HB 66/80) des Rechenzentrums der Universität Mainz und mit dem programmierbaren Rechner TI 58.

Häufigkeitsstatistiken und multivariate Korrelationsanalysen wurden mit Programmen der Programmbibliothek des Anthropologischen Instituts durchgeführt. Laborwerte, die einer logarithmischen Normalverteilung gehorchen, mußten transformiert werden (Kreatin im Serum, Kreatin im Urin, SGOT, SGPT). Alle anderen angewandten Testverfahren sind verteilungsunabhängig (nichtparametrische Tests).

Für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurden der U-Test (WILCOXON, MANN und WHITNEY; aus SACHS 1974) und bei größeren Stichproben ($n > 30$) der z-Test (RICHTERICH und COLOMBO 1978) gerechnet. Der Vergleich zweier abhängiger Stichproben erfolgte mit dem Wilcoxon-Test (Paardifferenztest).

4.1.1. Anthropometrische Untersuchung

Die anthropometrische Untersuchung wurde nach der von R. MARTIN beschriebenen Technik durchgeführt, die angegebenen Nummern weisen auf die entsprechenden Maße hin (MARTIN, R. und SALLER, K., Lehrbuch der Anthropologie Bd. I, 1959). Die Messung der Gliedmaßen berücksichtigt alle vier Extremitäten. Einige Hautfaltenmaße, die nach H. BONATZ (Dissertation 1970) übernommen wurden, sind durch ein hochgestelltes Kreuzchen⁺ gekennzeichnet. Die Hautfaltenmessung erfolgte mittels eines Harpenden Skinfold Calipers (JOHN BULL, British Indicators LTD, St.Albans, England) mit einem konstanten Druck von 960 gms (10 gm/sq.mm). Die zu messende Hautfalte mit dem anhaftenden subcutanen Gewebe wird dabei mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand gefaßt und vom darunterliegenden Muskel abgehoben. Etwas unterhalb der haltenden Finger ist die Hautfalte mit dem Skinfold Caliper zu messen. Der Wert auf dem Anzeigeeinstrument läßt sich auf 0,1 mm genau ablesen. In einigen Fällen, insbesondere bei Meßwerten über 20 mm, ergibt sich keine konstante Anzeige, sondern es resultiert eine stete Abnahme des angezeigten Wertes, die auf eine Abplattung des Gewebes zurückzuführen ist. Hier muß die Ablesung des Anzeigeeinstruments gemäß den Empfehlungen des Herstellers sofort nach der Einwirkung des gesamten Drucks der Hebelarmbacken des Skinfold Calipers auf die Hautfalte erfolgen. Die Methode hat den Vorteil der einfachen Durchführbarkeit, allerdings läßt sich hierdurch der Körperfettgehalt nicht so genau abschätzen, wie durch Ermittlung des spezifischen Gewichts (Unterwasserwiegen) oder Anwendung von chemischen Verdünnungsmethoden (TANNER und WHITEHOUSE 1955).

Zur Messung der Handdruckkraft wurde das Vigorimeter der Fa. Gebr. Martin, Tuttlingen verwendet. Es besteht aus einem Manometer, mit einer in Kilopascal (kPa) geeichten Skala und drei auswechselbaren verschieden großen Gummibällen, die über einen Druckschlauch an das Anzeigeeinstrument angeschlossen werden. Erwachsene sollten jeweils den

großen und den mittleren Ballon mit maximaler Handkraft zusammendrücken. Die Messung erfolgte ohne Zuhilfenahme des Daumens (FÜNFELD 1966; KLIMT 1969). Die weiteren anthropometrischen Untersuchungen sind dem Schlüssel für die Eintragungen in das Untersuchungsblatt zu entnehmen.

4.1.2. Laborchemische Untersuchung

In Kapitel 2 wurde der Kreatinstoffwechsel dargestellt. Er ist insbesondere von der regelrechten Funktion von Leber, Muskulatur und Niere abhängig. Um Störungen im Stoffwechsel dieser Organe auszuschließen und zur Beurteilung der renalen Elimination harnpflichtiger Substanzen, erfolgten zusätzliche klinisch-chemische Untersuchungen (Kartenart 3 auf dem Untersuchungsblatt). Probanden mit Laborwerten außerhalb der Normbereiche konnten deshalb zur Erstellung der Normwerte für die Kreatinkonzentrationen in Serum und Urin nicht herangezogen werden. Kreatinin in Serum und 24-Stunden-Harn korreliert mit dem Ausmaß der Muskelmasse und erlaubt zudem eine Aussage über die Funktion der Niere. Ergänzende Hinweise auf die Ausscheidung wasserlöslicher Stoffwechselendprodukte lassen sich mit Hilfe des anorganischen Phosphats, des Harnstoffs und der Harnsäure in Serum und Urin gewinnen. Diese Meßgrößen sind allerdings in gewissem Umfang von der aufgenommenen Nahrung abhängig.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten von CK und SGOT dient der Aufdeckung von Schädigungen der Muskelzelle. Erkrankungen der Leber und der Gallenwege lassen sich an Hand der Volumenaktivitäten von SGOT, SGPT, GLDH, AP und γ -GT differentialdiagnostisch beurteilen bzw. ausschließen.

4.1.2.1. Harnpflichtige Substanzen und anorganisches Phosphat

Die harnpflichtigen Substanzen (Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure) und das anorganische Phosphat wurden nach dem Prinzip der kontinuierlichen Durchflußanalyse (continuous flow-Analyse) mit einem Automaten des Typs AutoAnalyser

Kartenart 3

Kontrollnummer

vierstellig

Serum:

Kreatin		mg/100 ml, enzymatisch Eppendorf Photometer
Kreatinin	]	
anorganisches		mg/100 ml, chemisch
Phosphat		TECHNICON AutoAnalyzer
Harnstoff		SMA 6/60 Plus
Harnsäure	]	
SGOT		U/ml UNION CARBIDE
SGPT		CentrifiChem ^R System 400
GLDH		U/ml
CK	]	Eppendorf Enzymautomat
AP		U/ml UNION CARBIDE
γ-GT		CentrifiChem ^R System 400

Urin:

Kreatin		mg/100 ml, enzymatisch Eppendorf Photometer
Kreatinin	]	
Anorganisches		mg/100 ml, chemisch
Phosphat		TECHNICON AutoAnalyzer
Harnstoff		SMA 6/60 Plus
Harnsäure	]	
pH		Spezialindikatorstäbchen Merck Neutralit ^R pH 5 - 10

SMA 6/60 Plus (TECHNICON) gleichzeitig- aber in verschiedenen Kanälen nebeneinander - bestimmt. Anteile der eingesetzten Seren bzw. der um den Faktor 21 mit destilliertem Wasser verdünnten Urinproben werden automatisch in kontinuierlich fließende, durch Luftblasen segmentierte Reagenströme eingespeist. Der Flüssigkeitstransport wird dabei durch Schlauchpumpen bewirkt. Die Proben werden hierbei nicht nur gegen Wasser dialysiert, sondern auch mit den für den Reaktionsablauf notwendigen Reagenzien versetzt, in Spiralen gemischt und erwärmt. Nach einer durch die Fließgeschwindigkeit und die Schlauchlänge genau definierten Zeit passieren die Proben jeweils ein Durchflußphotometer. Die auftretenden Extinktionsänderungen werden von einer Rechneinheit ausgewertet und die vier Analyseergebnisse nacheinander von einem Schreiber auf dem entsprechenden Auswertungsbogen aufgezeichnet. Da die Messungen im steady state erfolgen, ist die Mitführung von Standardlösungen nach jeder zehnten Probe zur manuellen Kalibrierung notwendig.

Normbereiche (Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätskliniken Mainz)

<u>Serum</u>	<u>Männer</u>	<u>Frauen</u>
Kreatinin i.S.	0,7 - 1,4	mg/100 ml
anorganisches Phosphat i.S.	2,2 - 4,2	mg/100 ml
Harnstoff i.S.	20 - 60	mg/100 ml
Harnsäure i.S.	4,2 - 7,8	2,6 - 6,3 mg/100 ml
<u>Urin</u>		
Kreatinin i.U.	0,5 - 2,5	g/24 Std.
anorganisches Phosphat i.U.	0,8 - 2,0	g/24 Std.
Harnstoff i.U.	20 - 35	g/24 Std.
Harnsäure i.U.	0,2 - 1,0	g/24 Std.
pH	4,5 - 9,0	

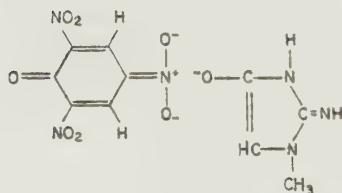
Auf Grund der engen Verknüpfung von Kreatin und Kreatinin im Muskelstoffwechsel erscheint es notwendig, gesondert auf die Kreatininbestimmung einzugehen.

Kreatininbestimmung am AutoAnalyzer

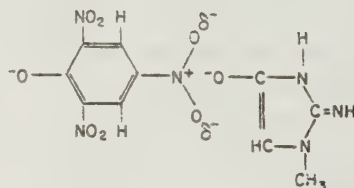
Meßprinzip: Photometrische "steady state" Messung
SMA 6/60 Plus bzw. SMA II

Die Serum- bzw. Harnprobe wird zur Abtrennung des Kreatinins vom Serum gegen Wasser dialysiert. Das im Dialysat enthaltene Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure eine orangerote Verbindung (Jaffé-Reaktion), deren Farbintensität der Kreatinin-konzentration proportional ist und bei 505 nm photo-metrisch gemessen wird. Die Methode ist nicht spezifisch, da neben Kreatinin auch verschiedene andere Stoffe zur Farbentwicklung beitragen (PRELLWITZ 1976). Eine Viel-zahl von Methoden, die eine selektivere Kreatininbe-stimmung ermöglichen sollen, wurde beschrieben; die meisten sind für Routineuntersuchungen nicht geeignet (Lit. in RICHTERICH und COLOMBO 1978). Die mit der SMA AutoAnalyzer-Technik erzielten Meßwerte für das Gesamt-kreatinin ("Gesamtchromogene") liegen niedriger als bei Verwendung anderer Pikrinsäuremethoden. Jedoch ergaben sich auch hiermit noch um durchschnittlich 20 - 25 % zu hohe Serum-Kreatininkonzentrationen im Vergleich mit einer spezifischen enzymatischen Bestimmungsmethode (SZASZ et al. 1977).

Meßreaktion: In alkalischem Milieu scheint Kreatinin mit Pikrinsäure im Überschuß in einer pseudo-monomolekularen Reaktion zu einem 1/1 Komplex zu reagieren (VASILIADES 1976).



(IV)



(V)

Reagenzien: 1,8 %ige NaCl-Lösung (mit 0,1 % (v/v)
Brij-35⁺)
0,1 %ige (v/v) wäßrige Brij-35-Lösung
0,5 N NaOH-Lösung
gesättigte Pikrinsäure-Lösung (13 g
Pikrinsäure in 1000 ml H₂O)

⁺Brij-35 30 % (= Polyoxyäthylenlauryläther) als Detergenz

Haltbarkeit: Proben bei 2°C - 8°C 24 Stunden haltbar
(TECHNICON 1977)
Proben bei -20°C unbegrenzt stabil
(PETER 1977)

Störungen: Nichtkreatininchromogene ("Pseudokreatinine")
führen ebenfalls mit Pikrinsäure zu einer
langsam verlaufenden Farbentwicklung und können deshalb
höhere Kreatininkonzentrationen vortäuschen: Glucose,
Lävulose, Ascorbinsäure, Pyruvat, Aceton, Acetessigsäure,
Barbiturate, Phenolrot, Bromthalein, L-Dopa, α -Methyldopa
und Aminohippursäure.

Kreatinin im Serum

Normalbereiche: mg / 100 ml μ mol / l

Kinder:

Nabelschnurblut	0,58 - 1,21	51,3 - 107,0
bis 3 Monate	0,40 - 0,60	35,4 - 53,0
3 - 7 Monate	0,33 - 0,42	29,2 - 37,1
7 - 12 Monate	0,24 - 0,40	21,2 - 35,4
1 - 5 Jahre	0,27 - 0,42	23,9 - 37,1
5 - 6 Jahre	0,35 - 0,45	30,9 - 39,8
6 - 12 Jahre	0,45 - 0,68	39,8 - 60,1

SITZMANN 1976

Erwachsene: 0,7 - 1,4 61,9 - 123,8
ZENTRALLABOR

Männer	0,55 - 1,10	49 - 97	enzymatisch
Frauen	0,48 - 0,90	42 - 80	"

SZASZ et al. 1977

Diagnostik(PRELLWITZ 1976, WEISS 1976,
THOMAS 1978)

Kreatinin im Serum erhöht:

Akute und chronische Nierenerkrankungen
 Akuter Muskelzerfall
 Chronische Hämodialyse und Überwachung der
 Diät bei chron. Niereninsuffizienz
 Eosinophiles Hypophysenadenom (Akromegalie)
 Herzinsuffizienz
 Durchfall, Erbrechen, profuses Schwitzen,
 hochdosierte Diuretikatherapie, Dursten
 Eiweißmangelsyndrom

Kreatinin im Urin

<u>Normalbereiche:</u>	<u>mg/kg KG/24 h</u>	<u>μmol/kg KG/24 h</u>
Kinder:		
Frühgeborene	8,3 - 19,9	73,4 - 175,9
2 - 12 Wochen		
Reifgeborene	10,0 - 15,5	88,4 - 137,0
6 - 12 Monate	5,2 - 20,4	46,0 - 180,3
2 - 3 Jahre	12,0	106,1
6 - 11 Jahre	6,4 - 21,8	56,6 - 192,7
Mädchen	12,2 - 29,4	107,8 - 259,9
12 - 17 Jahre		
Knaben	20,7 - 28,2	183,0 - 249,3
12 - 17 Jahre		
Erwachsene:		
	<u>g/24 h</u>	<u>mmol/24 h</u>
Männer	1,1 - 2,5	9,7 - 22,1
Frauen	0,01 - 1,33	0,09 - 11,8
		SITZMANN 1976
Erwachsene	0,5 - 2,5	4,4 - 22,1
		ZENTRALLABOR

Diagnostik

(PRELLWITZ 1976, WEISS 1976,
THOMAS 1978)

Kreatininausscheidung im 24 Std.-Urin erhöht:

Physiologisch: Durch viel gebratenes Fleisch in der
Nahrung (besonders stark erhitzte Rand-
partien).

Pathologisch: Eosinophiles Hypophysenadenom
Hypophysärer Riesenwuchs
Diabetes mellitus
Hypothyreose
Infektionskrankheiten

Kreatininausscheidung im 24 Std.-Urin erniedrigt:

Progressive Muskelatrophie (Erb)
Duchenne-v. Leyden-Syndrom
Krabbe-Syndrom (II)
Dermatomyositis (fortgeschrittener Zustand)
Lähmungen
Hochgradige Niereninsuffizienz
Hyperthyreose
Anämie
Leukämie in Remissionsphase

4.1.2.2. Enzyme

Im Serum der Probanden wurden die Volumenaktivitäten verschiedener Enzyme mit Hilfe von optimierten Standardmethoden bestimmt. Die Messungen erfolgten kinetisch mit Analysenautomaten.

Normbereiche (Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätskliniken Mainz)

	<u>Männer</u>	<u>Frauen</u>	
SGOT	6 - 21	5 - 18	U/1
SGPT	6 - 23	5 - 21	U/1
GLDH	bis 4		U/1
CK	10 - 70	10 - 60	U/1
AP	bis 200		U/1
γ -GT	6 - 28	4 - 18	U/1

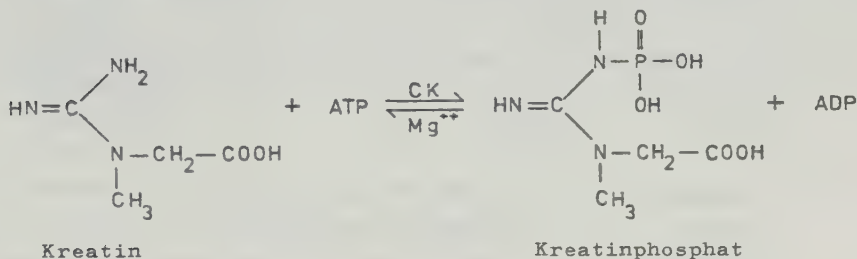
Wegen der Wichtigkeit der Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und der Creatin-Kinase, insbesondere für die Erfassung von Läsionen an Skelettmuskulatur und Herzmuskel, werden die beiden Enzyme gesondert vorgestellt.

CK Creatin-Kinase

(CPK Creatin-Phospho-Kinase)

E.C. 2.7.3.2 ATP:Creatin-Phosphotranferase

Die Creatin-Kinase katalysiert den Aufbau von Kreatinphosphat in der ruhenden Muskelzelle, wie auch bei Bedarf die schnelle Bereitstellung von energielieferndem ATP.



Die enzymatische Reaktion folgt dem Zufalls-Mechanismus (random order) (BERGMEYER 1977). Bei pH 9 liegt das Gleichgewicht auf der rechten Seite, beim pH des Sarkoplasmas von etwa 6,0 ist die Bildung von ATP auf Kosten von Kreatinphosphat weitaus begünstigt (LEHNINGER 1975).

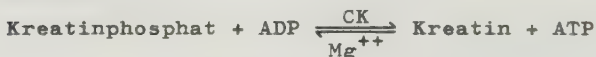
Die Creatin-Kinase ist ein aus den Untereinheiten M und B zusammengesetztes dimeres Enzym. Die drei Isoenzyme CK-MM, CK-BB und CK-MB zeigen unterschiedliche kinetische, elektrophoretische und immunologische Eigenschaften. Ihre Verteilung im Körpergewebe ist organtypisch. So findet sich die CK-MM in erster Linie im Skelettmuskel, die CK-BB im Gehirn. Bei intakter Blut-Liquor-Schranke läßt sich das Isoenzym CK-BB nicht im Serum nachweisen. Das Hybrid MB ist hauptsächlich in den Mitochondrien des Herzmuskels lokalisiert (PRELLWITZ 1976). Der Anteil der CK-MB an der Gesamt-CK-Aktivität des Herzmuskels beträgt etwa 40%, beim Skelettmuskel sind dies nur etwa 3%. Nach einer Schädigung von Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Hirngewebe kann die aus den Zellen ausgetretene CK im Serum gemessen werden. Die Enzymaktivität ist dabei abhängig von der Menge des nekrotischen Gewebes (THOMAS 1978). Von differentialdiagnostischer Be-

deutung ist die Unterscheidung von Herzmuskel- und Skelettmuskelschäden. Sie ist neuerdings durch die Bestimmung der Volumenaktivität der CK-MB mit Hilfe eines immunologischen Inhibitionstests möglich. Mit der Messung der Gesamt-CK-Aktivität werden hingegen alle drei Isoenzyme erfaßt.

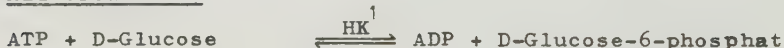
<u>Vorkommen:</u>	Skelettmuskel	2030 U/g Organ
	Gehirn	670 U/g Organ
	Herz	350 U/g Organ
	Glatte Muskel	12 U/g Organ
	Niere	2 U/g Organ
	Leber	0,7 U/g Organ

Meßprinzip: CK NAC-aktiviert (Optimierter UV-Test)
Merckotest^R R 14 317

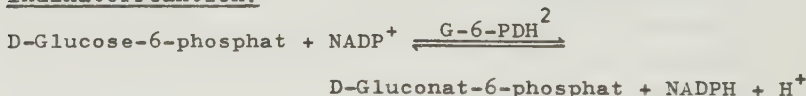
Meßreaktion:



Hilfsreaktion:



Indikatorreaktion:



1 HK Hexokinase E.C. 2.7.1.1 ATP:D-Hexose-6-Phosphotransferase

2 G-6-PDH Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
E.C. 1.1.1.49 D-Glucose-6-Phosphat:NADP-oxidoreductase

Konzentrationen im Test:

100 mmol/l Imidazol-Acetat-Puffer, pH 6,7
30 mmol/l Phosphocreatin
20 mmol/l Glucose
20 mmol/l N-Acetylcystein

10 mmol/l Magnesiumacetat
 2 mmol/l EDTA
 2 mmol/l ADP
 2 mmol/l NADP
 5 mmol/l AMP
 10 μ mol/l Adenosin(5')pentaphospho(5')-adenosin
 $\geq 1,5$ kU/l Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
 $\geq 2,5$ kU/l Hexokinase

Volumina:

2,50 ml Reaktionslösung
 0,10 ml Probe

Meßtemperatur: 25°C
 Filter: 334 nm

Die Methode ist spezifisch für Creatin-Kinase. Meßgröße ist die Zunahme der NADPH-Konzentration pro Zeiteinheit, sie ist der CK-Aktivität im Probenmaterial direkt proportional.

Da die am aktiven Zentrum der CK beteiligten SH-Gruppen in kurzer Zeit oxidiert werden, ist eine vollständige Reaktivierung durch das im Ansatz enthaltene N-Acetylcystein (NAC) notwendig. Dieser neue Aktivator reagiert im Gegensatz zu dem bisher verwendeten Glutathion (GSH) nicht mit dem Enzym Glutathion-Reduktase. Eine durch Myokinase MK (= Adenylatkinase AK, E.C. 2.7.4.3. ATP:AMP-Phosphotransferase) ausgelöste Störreaktion wird durch den Zusatz von Adenosin-5-monophosphat (AMP) und Diadenosinpentaphosphat, einem extrem wirksamen Adenylatkinase-Inhibitor, gehemmt.



Haltbarkeit: Serum einen Tag bei Zimmertemperatur
 bzw. eine Woche bei $+4^{\circ}\text{C}$ haltbar
 (Produktinformation Merck).

Störungen: Intramuskuläre Injektionen von Pharmaka
 und geringgradige Muskeltraumen können zu
 einem CK-Anstieg im Serum führen. Der Test wird durch
 Hämolyse bis zu einer Hämoglobinkonzentration von 200 mg/
 100 ml Serum nicht gestört (Produktinformation Merck).

CK im SerumNormalbereiche:

Frühgeborene 1.-10. Tag	35 - 107
11.-35. Tag	25 - 72
Reife Neugeborene	56 - 138
3. Woche - 3. Monat	30 - 70
3. - 9. Monat	20 - 50
9. -12. Monat	15 - 50
Kleinkinder	15 - 45
Schulkinder	18 - 44
Erwachsene	15 - 52

U/1 CK GSH-aktiviert

SITZMANN 1976

U/1 CK NAC-aktiviert

Männer	10 - 70
Frauen	10 - 60

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR
KLINISCHE CHEMIE 1977

Männer	10 - 80
Frauen	10 - 70

CHEMNITZ et al. 1979

Erwachsene	bis 70
------------	--------

ZENTRALLABOR

Die Werte sind weder normal noch log-normal verteilt (RICHTERICH und COLOMBO 1978). Frauen haben niedrigere Referenzwerte als Männer oder Knaben über 10 Jahre. Dies kann genetischer Natur sein und auch auf unterschiedlicher Muskelmasse und körperlicher Aktivität von Männern und Frauen beruhen. Individuen mit ausgesprochen starker Muskelmasse weisen höhere Werte auf. Schwere körperliche Arbeit von langer Dauer (z.B. Dauerlauf) führt im Gegensatz zu einer kurzdauernden Arbeit zu einer merklichen Erhöhung der Creatin-Kinase-Aktivität im Serum. Alkoholkonsum und orale Antikonzeptiva beeinflussen die Enzymaktivität nur geringfügig (RICHTERICH und COLOMBO 1978).

Diagnostik(PRELLWITZ 1976, WEISS 1976,
THOMAS 1978)

CK im Serum erhöht:

Physiologisch: Nach schwerer körperlicher Belastung (Sport)
Schwangerschaft
Geburt

Pathologisch: Alle Formen der Muskeldystrophie
Polymyositis
Dermatomyositis
Muskeltraumen
Myokardinfarkt
Praktisch alle Formen der exogenen Intoxi-
kationen
Epileptische und tetanische Anfälle
Gangrän (Diabetes mellitus)
Arterielle Embolien (A. femoralis oder
A. poplitea) mit ischämischen Muskel-
nekrosen
Kardioversion (CK aus der Skelettmuskulatur)
Herzkatheterismus

CK-MB

CK-MB NAC-aktiviert (UV-Test)
Immunologischer Hemmtest
Merckotest^R 14 326

Bei Patienten mit Verdacht auf eine myokardiale Schädigung
wurde auch die Volumenaktivität der CK-MB bestimmt.

Testprinzip: siehe CK NAC-aktiviert

Der Testansatz enthält zusätzlich zu den unter CK ange-
gebenen Reagenzien inhibierende CK-M-Antikörper von der
Ziege. Hierdurch wird in der Vorinkubationszeit von zehn
Minuten die Aktivität der CK-M-Untereinheiten der Isoen-
zyme CK-MM und CK-MB immunologisch vollständig gehemmt.
Die Aktivität der CK-B-Untereinheit wird hierdurch nicht
beeinflusst. In der anschließenden kinetischen Enzymbe-
stimmung wird deshalb nur die katalytische Aktivität der
Untereinheit CK-B gemessen. Da CK-BB normalerweise nicht

im Serum vorhanden ist, kann durch Multiplikation des Meßergebnisses mit dem Faktor 2 die Volumenaktivität der CK-MB der Serumprobe berechnet werden.

Störungen: Die im Testansatz vorhandenen Antikörper können CK-MM-Aktivitäten bis zu 1000 U/l vollständig hemmen. Seren mit höherer Gesamt-CK-Aktivität müssen mit physiologischer NaCl-Lösung auf Werte unter 1000 U/l vorverdünnt werden.

CK-MB im Serum

Normalbereiche:

Die in Normalseren vorkommende CK-MB-Aktivität liegt unter der mit dieser Routinemethode erreichbaren Nachweisgrenze. Es läßt sich daher nur eine Entscheidungsgrenze für das gesicherte Vorliegen einer CK-MB-Aktivität in der Probe angeben.

Entscheidungsgrenze CK-MB: 10 U/l

Diagnostik

Die Bestimmung der CK-MB ist differentialdiagnostisch nur bei einer CK-Gesamtaktivität über 100 U/l sinnvoll.

Es geben einen Hinweis auf

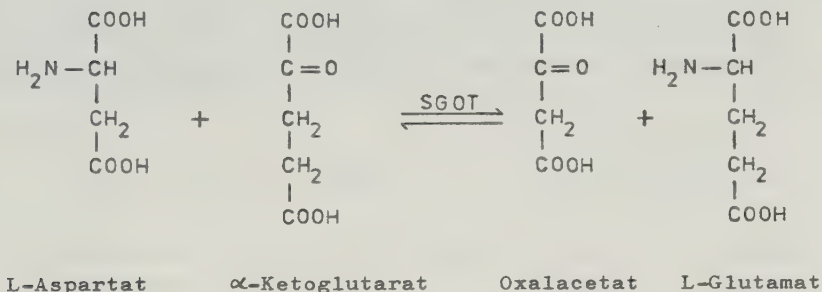
Myokardschaden: CK-MB $> 6\%$ der CK-Gesamtaktivität
Skelettmuskelschaden: CK-MB $< 6\%$ der CK-Gesamtaktivität

(NEUMEIER, PRELLWITZ, LANG
und KNEDEL 1978)

SGOT Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
(Aspartat-Amino-Transferase)

E.C. 2.6.1.1 L-Aspartat:2-oxoglutarat-amino-
transferase

Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase kommt in zwei molekularen Formen vor, einem cytoplasmatischen und einem mitochondrialen Enzym. Die beiden Enzymproteine besitzen unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung, elektrophoretische Mobilität, kinetische und immunologische Eigenschaften. Beide Formen (aus Schweineherzen isoliert) haben ein Molekulargewicht von etwa 90 000 und besitzen zwei Untereinheiten von fast gleicher Größe (LEHNINGER 1975).



Die von der SGOT katalysierte Reaktion gehört dem Aminosäurestoffwechsel an und ist frei reversibel. Als prosthetische Gruppe wird Pyridoxalphosphat benötigt, welches zwischenzeitlich als Akzeptor für die α -Aminogruppe dient. Das so gebildete Pyridoxaminphosphat kann diese Aminogruppe nun auf die Ketosäure übertragen (Ping-Pong-Mechanismus) (LEHNINGER 1975).

Im Cytosol läuft die Transaminierung unter Bildung von Glutamat ab, wobei auch andere α -Aminosäuren als Reaktionspartner auftreten können. Die mitochondriale Form des Enzyms katalysiert die Reaktion zum Aspartat, das ein Aminogruppendonator des Harnstoffzyklus ist.

Vorkommen: SGOT ist in allen Geweben vorhanden

Leber	59 U/g Organ
Herzmuskel	52 U/g Organ
Skelettmuskel	36 U/g Organ
Gehirn	15 U/g Organ
Niere	10 U/g Organ
Pankreas	3 U/g Organ
Lunge	1 U/g Organ
Erythrozyten	0,8 U/g Organ
	WEISS 1976

Meßprinzip: GOT UV-Test opt.

ROCHE Diagnostica No. 1417

Meßreaktion:

L-Aspartat + α -Ketoglutarat $\xrightleftharpoons{\text{SGOT}}$ L-Glutamat + Oxalacetat

Indikatorreaktion:

Oxalacetat + NADH + H⁺ $\xrightleftharpoons{\text{MDH}^1}$ Malat + NAD⁺

1 MDH Malat-Dehydrogenase E.C. 1.1.1.37 Malat:NAD-oxidoreductase

Konzentrationen im Test:

200 mmol/l	L-Aspartat
12 mmol/l	α -Ketoglutarat
>1500 U/l	LDH
> 600 U/l	MDH
0,18 mmol/l	NADH
80 mmol/l	Phosphat-Puffer pH 7,4

Volumina:

0,040 ml Probe

0,095 ml Probe + Verdünnung

0,250 ml Reaktionslösung

Meßtemperatur: 25°C

Filter: 334 nm

Die Methode ist bei ausreichender Reinheit der Hilfsen-

zyme MDH und LDH (zur Vermeidung einer Störung durch Pyruvat) spezifisch für Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase. Meßgröße ist die Abnahme der NADH-Konzentration pro Zeiteinheit, sie ist der Aktivität der SGOT im Probenmaterial direkt proportional.

Haltbarkeit: 5% Aktivitätsverlust nach 2 Tagen Lagerung des Serums bei + 4°C (PETER 1977).

Störungen: Hämolytische oder stark lipämische Seren dürfen nicht verwendet werden.

SGOT im Serum

Normalbereiche:

U/1

Reife Neugeborene	11 - 35
Säuglinge 3. Woche - 6. Monat	8 - 28
6. - 12. Monat	10 - 28
6. - 14. Jahr	4 - 18
Erwachsene	- 18

SITZMANN 1976

Männer	6 - 21
Frauen	5 - 18

LAUDAHN et al. 1970;
ZENTRALLABOR

Männer	8 - 17
Frauen	6 - 15

PRELLWITZ 1976

Es liegt eine log-normale Verteilung vor. Die Abhängigkeit der SGOT vom Körpergewicht ist gering. Die Enzymaktivität wird durch die Einnahme von Kontrazeptiva nicht beeinflusst (RICHTERICH und COLOMBO 1978).

Diagnostik

(PRELLWITZ 1976, WEISS 1976,
THOMAS 1978)

Die erhöhte Aktivität im Plasma nach Zellschädigung beruht größtenteils auf dem zytoplasmatischen Isoenzym.

SGOT im Serum erhöht:

- Herz: Myokardinfarkt 170 - 250 U/l
 Nach Herzoperationen
- Leber: Die SGOT soll im Zusammenhang mit der
 SGPT beurteilt werden.
 Akute Virushepatitis
 Chronisch aggressive Hepatitis
 Chronisch persistierende Hepatitis
 Leberzirrhose
 Infiltrative Krankheiten der Leber
 Akut toxische Leberschäden (Alkohol,
 Halothan, Oestrogen-Gestagen-Präparate)
- Skelettmuskel: Das Enzym stammt aus den affizierten
 Muskelfasern
 Progressive Muskeldystrophie (Duchenne-
 Typ, Gliedergürtel-Typ, Facio-skapulo-
 humeraler Typ)
 Neurogene Muskelatrophie
 Dermatomyositis
 Muskeltraumen
 Myoglobinurie

4.2. Querschnittsuntersuchung: Gesamtstichprobe

Zur Erstellung von Normalwertbereichen für die Kreatinkonzentration im Serum stehen Daten von insgesamt 158 Männern und 152 Frauen zur Verfügung. Bei einer Teilstichprobe von 52 männlichen und 49 weiblichen Probanden werden neben den Laboruntersuchungen auch 36 anthropometrische Variablen berücksichtigt. Beide Gruppen unterscheiden sich bezüglich der Laborwerte nur geringfügig voneinander, sie werden deshalb gemeinsam betrachtet. Die Abb. 4.02 zeigt die Altersverteilung der Probanden in beiden Stichproben. Anthropometrisch untersuchte Probanden sind häufiger unter den jüngeren Männern und Frauen zu finden. Korrelationen mit dem Alter sind für Kreatin und Kreatinin im Serum und Spontanurin nicht gegeben. Dagegen ergeben sich für die subscapular gemessene Hautfalte (36) bei Männern und Frauen hochsignifikante Korrelationen mit dem Lebensalter (Männer: $r = 0,54$, $p < 0,1$; Frauen: $r = 0,53$, $p < 0,1$).

Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationsbreiten der erfaßten Variablen sind entsprechend dem Untersuchungsblatt (Abb. 4.01) in den Tabellen 4.01 a) bis 4.01 d) dargestellt. Tabelle 4.01 e) enthält zusätzlich berechnete Werte für Androgynie-Score, Rees-Eysenck-Index, Körperoberfläche sowie Extremitäten-Muskelumfänge und fettfreien Abdomenumfang.

Muskelumfänge (mm)

Oberarmmuskelumfang (mm)	= Oberarmumfang - $\pi/2 \cdot$
64,66	(Hautfalte Biceps + Hautfalte Triceps)
Unterarmmuskelumfang (mm)	= Unterarmumfang - $\pi/2 \cdot$
65,67	(Hautfalte Radius + Hautfalte Ulna)
Oberschenkelmuskelumfang (mm)	= Oberschenkelumfang - $\pi \cdot$
68,70	(Hautfalte Oberschenkel)
Unterschenkelmuskelumfang (mm)	= Unterschenkelumfang - $\pi \cdot$
69,71	(Hautfalte Unterschenkel)
Fettfreier Abdomenumfang (mm)	= Abdomenumfang - $\pi/2 \cdot$ (Hautfalte Abdomen + Hautfalte Suprailiaca)
72	

Die Dicke der Hautfalten ist ein quantitatives Kriterium für die Beurteilung von Magerkeit bzw. Fettleibigkeit, denn mehr als die Hälfte des Körperfettes ist im Unterhautfettgewebe abgelagert (CREMER et al. 1974). Zur besseren Beurteilung der Muskelmasse werden daher neben den gemessenen Umfängen auch die berechneten Muskelumfänge in die Korrelationsmatrix aufgenommen. Der Rohrer-Index (Index der Körperfülle) bietet einen Vergleichswert für die ganze Körpergröße. Er ist allerdings stark abhängig vom Ernährungszustand (v.EICKSTEDT 1940). Unter konstitutionswissenschaftlichem Aspekt ist auch die Frage nach Korrelationen zwischen Serumkonzentrationen von Kreatin und Kreatinin bzw. der Ausscheidung dieser Stoffe im Harn und dem Androgynie-Score, dem Rees-Eysenck-Index sowie der Körperoberfläche von Interesse. Die Berechnung der Körperoberfläche erfolgte nach der Formel von Du Bois (Oberfläche $[m^2] = \text{Gewicht}^{0,425} \cdot \text{Körperhöhe}^{0,725} \cdot 0,007184$); sie ist ein Beurteilungsmaßstab für die Gesamtheit der aktiv tätigen Gesamtmasse des Körpers (CREMER et al. 1974). Der Androgynie-Score (3 · Schulterbreite - Beckenbreite) gestattet eine noch schärfere Trennung zwischen den beiden Geschlechtern als der Schulter-Beckenbreiten-Index (TANNER 1951). Mit dem Rees-Eysenck-Index (100 · Körperlänge : 6 · Brustbreite) kann die Stellung eines Individuums in einer Reihe charakterisiert werden, die vom Pol relativer Schlankwüchsigkeit zum Pol relativer Rundwüchsigkeit reicht (v.ZERSSEN 1964). Körperlänge und Brustbreite weisen nämlich bei der Faktorenanalyse die höchsten positiven bzw. negativen Ladungen zu einem sogenannten Proportions- oder Typenfaktor auf, der der leptomorph-pyknomorphen Reihe im Sinne von KRETSCHMER entspricht (BERNHARD, im Druck).

Erwartungsgemäß korrelieren bei Männern Umfänge bzw. Muskelumfänge hochsignifikant mit dem Körpergewicht ($r = +0,75$ bis $+0,86$; $p < 0,001$), für Frauen sind diese Korrelationen nicht ganz so hoch ($r = +0,50$ bis $+0,79$; $p < 0,001$). In besonders hohem Maße korrelieren die Hautfaltenmaße der entsprechenden Meßpunkte von rechter und linker Körperseite miteinander ($r > 0,8$).

Hingegen ergeben sich zwischen anthropometrischen Meßwerten und Indices nur geringe Korrelationen mit Laborwerten der Serum- und Harnuntersuchung. Die gefundenen höheren Werte für r bei Betrachtung von Männern und Frauen gemeinsam lassen sich auf geschlechtsspezifische Unterschiede zurückführen (Tab. 4.02).

Tabelle 4.03 verdeutlicht die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Mittelwerte der labor-chemisch erfaßten Variablen, sie sind größtenteils statistisch gesichert (siehe auch Tab 4.01 d)). Für Frauen bestehen hochsignifikante Korrelationen zwischen der Serum-Kreatin-Konzentration und der Kreatinkonzentration im morgendlichen Spontanurin ($r = +0,63$ bis $r = +0,87$), bei Männern sind diese nicht so deutlich ($r = +0,27$) (Tab.4.04). Die Tabelle zeigt auch die sich ergebenden gesicherten Mittelwertsdifferenzen bei Einteilung der weiblichen Probanden in 3 Gruppen, unter Berücksichtigung der Anwendung oraler Ovulationshemmer. Die besonders hohen Kreatinkonzentrationen in Serum und Spontanurin bei Gruppe IV (Frauen mit Ovulationshemmern) lassen eine starke hormonelle Beeinflussung dieser Parameter vermuten.

Die im Hinblick auf die Entwicklung der Muskulatur besonders interessierenden Meßgrößen Kreatin, Kreatinin, Creatinkinase und Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase sind in Histogrammform in den Abbildungen 4.02 bis 4.05 dargestellt. Für Kreatin im Serum und Urin läßt sich eine log-normale Verteilung nachweisen.

Probandenuntersuchung: Gesamtstichprobe

Variable	MÄNNER					FRAUEN				
	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$
1 Alter (Jahre)	158	30,6	8,4	18	60	152	30,7	10,5	18	59
5 Tag p. m.	-	-	-	-	-	46	13	7	2	30
6 Harnvolumen (ml)	52	132	76	27	423	49	96	78	15	315
7 Gewicht (kg)	52	72,5	10,0	52,6	99,0	49	58,1	7,5	45,0	78,0
8 Körperhöhe (mm)	52	1782	72	1625	1934	49	1645	54	1535	1758
9 Schulterbreite (mm)	52	397	24	324	448	49	359	18	315	395
10 Beckenbreite (mm)	52	286	17	248	319	49	274	17	246	306
11 vert. Brust- durchmesser (mm)	52	291	19	250	349	49	254	15	218	288
12 sag. Brust- durchmesser (mm)	52	199	15	166	242	49	178	16	145	213
Umfang (mm)										
13 Oberarm links	52	288	25	235	350	49	262	25	214	334
14 Unterarm links	52	266	18	228	308	49	230	14	202	261
15 Oberarm rechts	52	292	25	241	352	49	265	24	220	321
16 Unterarm rechts	52	272	18	238	311	49	234	14	208	267

MÄNNER

FRAUEN

Variable	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$
<u>Hautfalte (mm)</u>										
17 Biceps links	52	4,3	1,4	2,2	7,6	49	7,2	2,8	3,0	15,8
18 Triceps links	52	8,6	2,7	3,3	15,0	49	13,9	4,1	5,3	22,6
19 Radius links	52	5,5	1,6	2,7	11,4	49	7,5	2,1	4,3	12,0
20 Ulna links	52	4,2	0,7	2,8	5,8	49	6,1	1,7	3,5	11,3
21 Biceps rechts	52	4,1	1,1	2,1	7,3	49	6,9	3,3	2,6	16,6
22 Triceps rechts	52	8,3	2,4	3,8	14,2	49	14,0	4,4	5,5	24,1
23 Radius rechts	52	5,3	1,7	2,9	11,4	49	7,1	2,0	4,0	11,6
24 Ulna rechts	52	4,2	0,8	2,9	6,3	49	6,0	1,6	3,2	11,6
<u>Umfang (mm)</u>										
25 Oberschenkel links	52	541	35	455	625	49	538	39	462	628
26 Unterschenkel links	52	371	27	278	433	49	354	22	309	407
27 Oberschenkel rechts	52	540	35	459	628	49	536	36	457	621
28 Unterschenkel re.	52	372	25	287	432	49	354	22	314	396
<u>Hautfalte (mm)</u>										
29 Oberschenkel links	52	12,8	5,4	3,7	27,1	49	28,4	7,1	12,0	40,2
30 Unterschenkel links	52	7,5	2,5	3,3	15,8	49	13,3	4,2	5,1	26,3
31 Oberschenkel rechts	52	12,5	5,0	3,4	22,6	49	29,3	7,1	14,5	42,5
32 Unterschenkel re.	52	7,7	2,3	3,0	13,8	49	13,7	4,4	4,9	26,0

MÄNNER

FRAUEN

Variable	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$
<u>Umfang (mm)</u>										
33 Abdomen	52	846	69	698	1038	49	773	65	638	936
<u>Lauffalte (mm)</u>										
34 Abdomen	52	13,1	5,7	3,8	30,5	49	12,2	5,1	4,7	29,1
35 Suprailiacal	52	15,3	6,5	4,2	30,0	49	13,7	5,6	4,5	26,3
36 Subscapular	52	11,0	3,4	6,2	20,0	49	12,0	4,5	5,2	24,1
<u>Umfang (mm)</u>										
37 Hand links	52	210	11	189	241	49	184	8	170	210
38 Hand rechts	52	212	11	186	236	49	188	9	171	206
<u>Vigorimeterdruck</u> <u>(kPa)</u>										
39 mittlerer Ballon li	52	132	23	78	172	49	87	14	55	123
40 mittlerer Ballon re	52	139	23	86	192	49	91	17	60	161
41 großer Ballon li	52	104	19	62	143	49	66	10	38	95
42 großer Ballon re	52	112	18	77	162	49	71	11	50	108
43 Rohrer-Index	52	1,28	0,15	0,89	1,78	49	1,31	0,14	1,00	1,76

MÄNNER

FRAUEN

MÄNNER						FRAUEN					
Variable	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$	
<u>Serum</u>											
<u>Substrat (mg/100ml)</u>											
44 Kreatin	158	0,36	0,16	0,12	1,24	152	0,55	0,23	0,14	1,28	
45 Kreatinin	158	1,1	0,2	0,7	1,4	152	0,9	0,1	0,6	1,4	
46 anorg. Phosphat	158	3,0	0,5	2,2	4,2	152	3,1	0,5	2,2	4,2	
47 Harnstoff	158	32	8	15	60	152	27	8	17	54	
48 Harnsäure	158	5,6	0,9	4,2	7,8	152	4,1	0,8	2,6	6,3	
<u>Enzym (U/l)</u>											
49 SGOT	158	9	2	6	16	152	9	2	5	18	
50 SGPT	158	11	4	6	11	152	9	3	5	21	
51 GLDH	158	1,9	0,8	0,5	4,0	149	1,8	0,9	0,5	4,0	
52 CK	158	40	15	7	70	152	29	10	7	59	
53 AP	154	103	27	46	200	136	84	23	34	153	
54 γ -GT	154	12	5	4	28	136	8	3	4	18	
<u>Urin</u>											
<u>Substrat (mg/100ml)</u>											
55 Kreatin	52	1,5	1,3	0,3	6,4	49	7,7	14,3	0,2	87,8	
56 Kreatinin	52	198	83	71	525	49	155	75	32	319	
57 anorg. Phosphat	52	63	44	13	191	49	56	38	5	162	
58 Harnstoff	52	2186	703	861	3955	49	1741	627	494	2876	
59 Harnsäure	52	64	22	11	128	49	56	19	17	90	
60 pH-Wert	52	6,3	0,6	5,5	7,5	49	6,2	0,6	5,5	7,5	

MÄNNER

FRAUEN

Variable	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$	n	$\bar{x}$	s	$x_{\min}$	$x_{\max}$
61 Androgynie-Score (cm)	52	90,6	6,6	69,4	103,8	49	80,3	5,1	68,8	89,4
62 Rees-Eysenck-Index	52	104	6,0	93	119	49	100	5,6	89	111
63 Körperoberfläche (m ²)	52	1,90	0,15	1,60	2,27	49	1,63	0,12	1,39	1,94
Muskelumfang (mm)										
64 Oberarm links	52	267	23,6	217	319	49	228	18,6	190	278
65 Unterarm links	52	251	17,1	214	289	49	208	10,4	180	231
66 Oberarm rechts	52	273	23,1	231	319	49	232	16,4	192	270
67 Unterarm rechts	52	257	17,1	221	291	49	214	11,2	188	241
68 Oberschenkel links	52	501	29,3	434	564	49	449	31,4	372	527
69 Unterschenkel links	52	348	25,0	259	411	49	313	19,4	281	369
70 Oberschenkel rechts	52	502	29,7	432	573	49	444	30,5	365	509
71 Unterschenkel re.	52	348	22,7	269	405	49	311	17,2	279	351
72 Fettfreier Abdomen- umfang	52	802	58,9	679	1005	49	732	55,1	607	861

Tab. 4.01 e)

Korrelationen

Variablen	Kreatin (mg/100 ml)		Kreatinin (mg/100 ml)	
	Serum	Urin	Serum	Urin

Männer und Frauen

Rohrer-Index	-0,01	-0,06	-0,03	-0,11
Androgynie-Score	-0,28 ---	+0,46 +++	-0,30 ---	+0,18 ++
Rees-Eysenck-Index	-0,09	+0,30 +++	-0,12 -	+0,32 +++
Körperoberfläche	-0,28 ---	+0,46 +++	-0,22 ---	+0,25 +++

Männer

Gewicht	-0,09	+0,09	+0,09	+0,28 +++
Körperhöhe	0,00	+0,12	-0,02	+0,24 ++
Vigorimeterdruck	-0,07	0,00	+0,04	+0,25 ++
gr. Ballon links				
Rohrer-Index	-0,12	-0,02	+0,13	+0,07
Androgynie-Score	-0,07	-0,15	+0,10	+0,11
Rees-Eysenck-Index	+0,21 ++	+0,20 +	+0,20 +	+0,23 ++
Körperoberfläche	-0,06	+0,11	+0,06	+0,29 +++
Fettfreier Abdomen-umfang	-0,17	+0,06	+0,18	+0,34 +++

Frauen

Gewicht	-0,03	-0,02	-0,27 --	+0,10
Körperhöhe	-0,06	+0,06	-0,14	+0,11
Vigorimeterdruck	-0,37 ---	-0,21 --	+0,05	+0,15
gr. Ballon links				
Rohrer-Index	-0,03	-0,08	-0,20 -	-0,29 ---
Androgynie-Score	-0,06	-0,07	-0,16 -	-0,16 -
Rees-Eysenck-Index	-0,14	-0,12	-0,02	+0,28 +++
Körperoberfläche	-0,05	0,00	-0,26 --	-0,22 --
Fettfreier Abdomen-umfang	-0,29 ---	-0,22 --	-0,26 --	-0,23 --

Vergleich der Mittelwerte (z-Test, nichtparametrisch)

	Männer	Frauen	Signifikanz
	$\bar{x}$	$\bar{x}$	
<u>Serum</u>			
<u>Substrat (mg/100ml)</u>			
Kreatin	0,36	0,55	---
Kreatinin	1,1	0,9	+++
anorg. Phosphat	3,0	3,1	
Harnstoff	32	27	+++
Harnsäure	5,6	4,1	+++
<u>Enzym (U/l)</u>			
SGOT	9	9	
SGPT	11	9	+++
GLDH	1,9	1,8	
CK	40	29	+++
AP	103	84	+++
γ -GT	12	8	+++
<u>Urin</u>			
<u>Substrat (mg/100ml)</u>			
Kreatin	1,5	7,7	--
Kreatinin	198	155	++
anorg. Phosphat	63	56	
Harnstoff	2186	1741	+++
Harnsäure	64	56	

Tab. 4.03

Gesamte Probandengruppe: Prüfung des Unterschiedes der Mittelwerte für Männer und Frauen.

+++ / --- signifikant auf dem 0,1 %-Niveau
 ++ / -- signifikant auf dem 1 %-Niveau
 + / - signifikant auf dem 5 %-Niveau

Probanden mit anthropometrischer Untersuchung (n = 101)

		Kreatin (mg/100 ml)				
		$\bar{x}_A$	s	$\bar{x}_G$	$x_{\min}$	$x_{\max}$ r
I	<u>Männer n = 52</u>					
	Serum	0,37	0,20	0,34	0,12 - 1,24	
	Urin	1,5	1,3	1,1	0,3 - 5,3	+0,27 +
II	<u>Frauen n = 49</u>					
	Serum	0,55	0,26	0,48	0,14 - 1,16	
	Urin	7,7	14,5	2,6	0,2 - 87,8	+0,72 +++
III	<u>Frauen n = 32</u> (ohne Ovulationshemmer)					
	Serum	0,51	0,27	0,44	0,14 - 1,10	
	Urin	5,1	8,8	1,8	0,2 - 31,4	+0,63 +++
IV	<u>Frauen n = 14</u> (mit Ovulationshemmer)					
	Serum	0,64	0,24	0,60	0,3 - 1,16	
	Urin	13,2	22,9	5,6	1,0 - 87,8	+0,87 +++

Prüfung der Mittelwerte auf Unterschiede (U-Test, z-Test)

		I	II	III	IV
I	Serum				
	Urin	-	-	-	-
II	Serum	0,18 +++			
	Urin	6,2 ++	-	-	-
III	Serum	0,14 +	-0,04		
	Urin	3,6 +	-2,6	-	-
IV	Serum	0,27 +++	0,09	0,13	
	Urin	11,7 +++	5,5	8,1 ++	-

Tab. 4.04

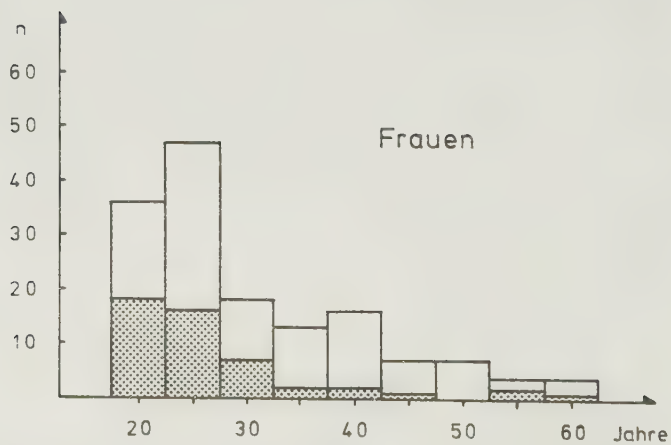
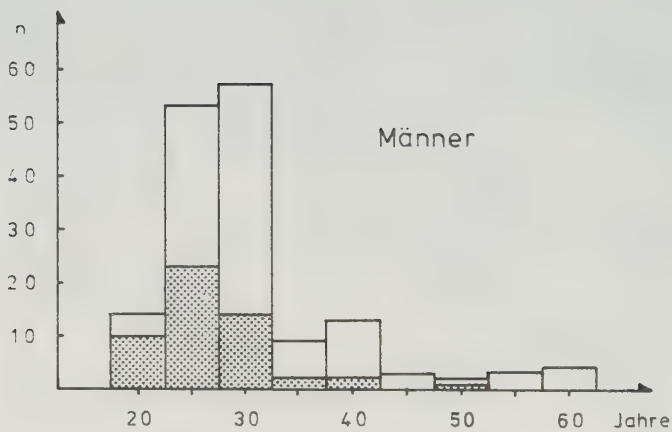
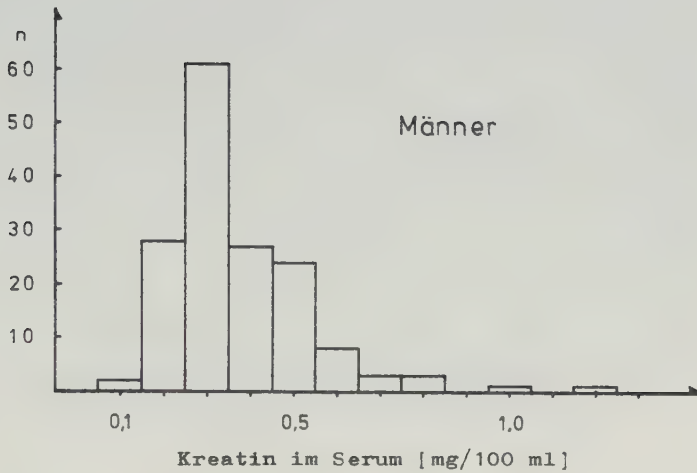


Abb. 4.01

Lebensalter der Probanden (Gesamtstichprobe)
 Der Anteil der anthropometrisch untersuchten
 Probanden ist durch die Punktierung dargestellt.



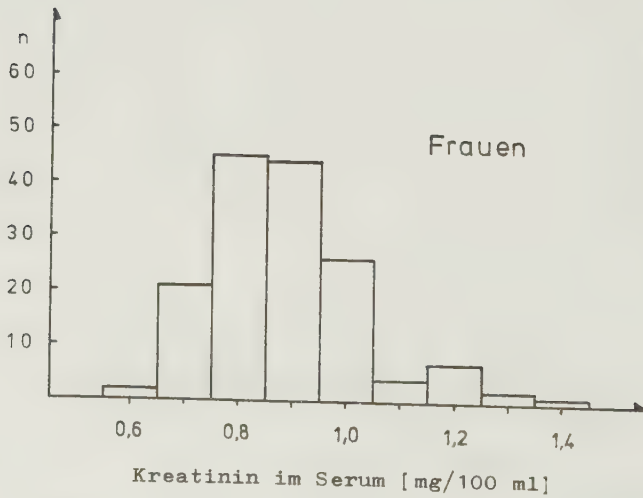
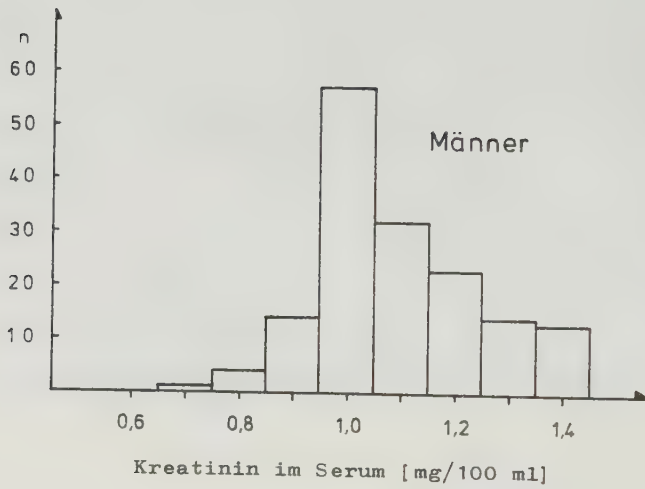


Abb. 4.03

Kreatinin im Serum (Gesamtstichprobe)

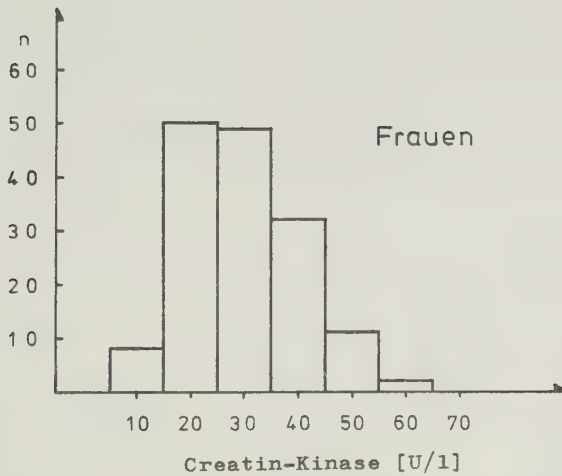
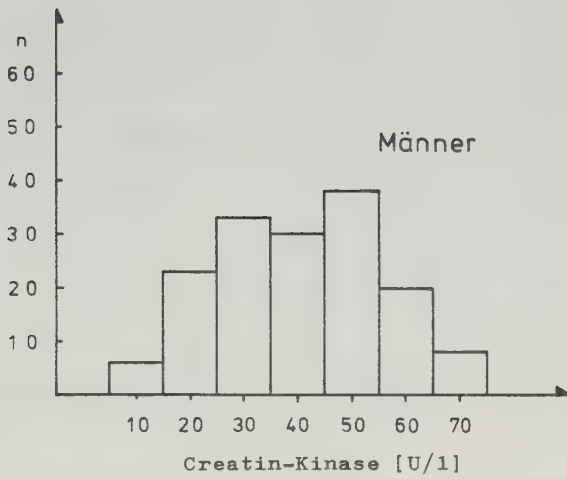


Abb. 4.04

Volumenaktivität der Creatin-Kinase im Serum
(Gesamtstichprobe)

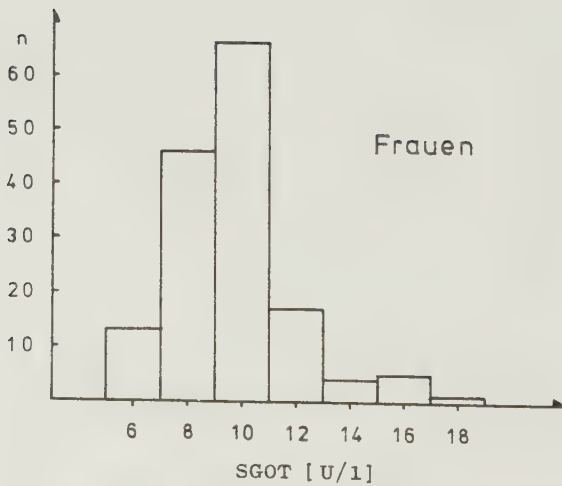
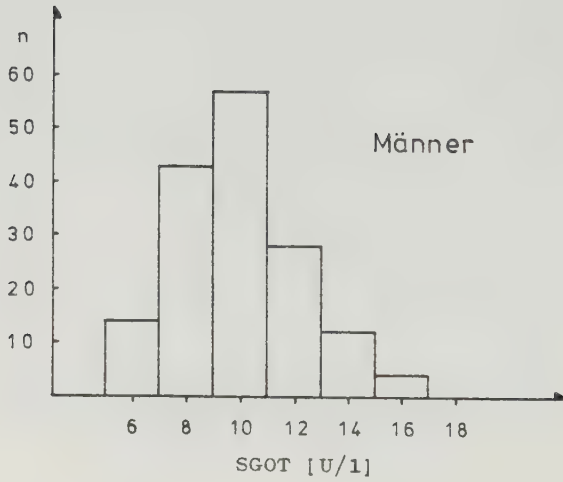


Abb. 4.05

Volumenaktivität der Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (SGOT) im Serum (Gesamtstichprobe)

4.3. Kreatin im Urin

4.3.1. Kreatinausscheidung im 24-Stunden-Urin

Die Sammlung von 24-Stunden-Urinen ist erfahrungsgemäß mit großen Fehlern behaftet. Diese ergeben sich in erster Linie durch Nachlässigkeiten und mangelnde Mitarbeit der Probanden; aber auch die unsachgemäße Aufbewahrung der Harnproben bis zur Analyse kann zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Es ist anzunehmen, daß sich durch die strikte Anleitung der Probanden und das schnelle Einfrieren der Harnproben diese Fehler weitgehend vermeiden ließen. Insgesamt nahmen 20 Männer (23 bis 39 Jahre) und 28 Frauen (19 bis 59 Jahre) an den Versuchen teil. Die Tabelle 4.05 zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationsbreiten und Korrelationskoeffizienten für 5 Probandengruppen. Die 3 Schwangeren aus Gruppe V befanden sich im ersten Trimenon. Bei allen 5 Gruppen besteht eine positive Korrelation zwischen der Kreatin- und Kreatininausscheidung im 24-Stunden-Harn.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,01$ besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Kreatinausscheidung bei Frauen, die orale Ovulationshemmer zur Empfängnisverhütung anwenden und Frauen, die keine einnehmen. Schwangere und Frauen während der Menopause bleiben unberücksichtigt. Die hormonale Kontrazeption hat scheinbar einen Einfluß auf die Kreatinausscheidung im 24-Stunden-Urin.

Die Differenz der Mittelwerte bei den männlichen Probanden und den Frauen, die keine oralen Ovulationshemmer einnehmen, läßt sich statistisch nicht sichern.

Tab. 4.06 zeigt einige ausgewählte Korrelationen für die Kreatin- und Kreatininausscheidung im 24-Stunden-Urin. Signifikante positive Korrelationen zwischen anthropometrischen und laborchemischen Variablen sind häufiger für Kreatinin gegeben. Nur bei Männern besteht für Kreatin ($r = +0,62$) und Kreatinin ($r = +0,60$) eine signifikante

24-Stunden-Urine

Kreatin- und Kreatininausscheidung (mg/24 h)

	$\bar{x}_A$	s	$\bar{x}_G$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	r
<u>I Männer n = 20</u>						
Kreatin	39,1	69,5	16,6	3,7	241,0	
Kreatinin	1882	284	1862	1310	2522	+0,63 ++
<u>II Frauen n = 28</u>						
Kreatin	158,1	203,1	60,3	6,3	806,0	
Kreatinin	1205	263	1178	756	1751	+0,29
<u>III Frauen n = 16</u> (ohne Ovulationshemmer)						
Kreatin	48,6	82,8	22,2	6,3	339,1	
Kreatinin	1165	240	1142	756	1641	+0,10
<u>IV Frauen n = 7</u> (mit Ovulationshemmer)						
Kreatin	326,0	172,6	277,4	68,4	638,2	
Kreatinin	1272	365	1228	921	1751	+0,48
<u>V Frauen n = 3</u> (Schwangere)						
Kreatin	369,4	384,7	242,9	80,2	806,0	
Kreatinin	1175	216	1161	942	1368	+0,97

Kreatinausscheidung im 24-Stunden-Urin (mg/ 24 h)

Prüfung der Mittelwerte auf Unterschiede (U-Test)

	I	II	III	IV	V
I	-	-	-	-	-
II	119 ++	-	-	-	-
III	10	110 +	-	-	-
IV	287 ++	-168 -	-	-	-
V	330 +	221	321 +	43	-

empirische Determiniertheit zum Rohrer-Index. Die hohen Korrelationen von Kreatin und Kreatinin mit der Harnstoffausscheidung lassen auf einen Zusammenhang mit der Aufnahme von Nahrungseiweiß schließen.

Variablen	<u>Korrelationen</u>	
	<u>Männer</u>	<u>Frauen</u>
	n = 20 r	n = 28 r
Kreatin/Alter	+ 0,52 +	- 0,09
Kreatinin/Alter	+ 0,11	- 0,35
Kreatin/Gewicht	+ 0,39	- 0,01
Kreatinin/Gewicht	+ 0,77 +++	+ 0,36
Kreatin/Körperhöhe	- 0,08	+ 0,26
Kreatinin/Körperhöhe	+ 0,37	+ 0,57 ++
Kreatin/Rohrer-Index	+ 0,62 ++	- 0,33
Kreatinin/Rohrer-Index	+ 0,60 ++	- 0,10
Kreatin/Harnvolumen	+ 0,13	- 0,09
Kreatinin/Harnvolumen	+ 0,12	+ 0,44 ++
Kreatin/Kreatinin	+ 0,63 ++	+ 0,29
Kreatin/Harnstoff	+ 0,82 +++	+ 0,55 ++
Kreatinin/Harnstoff	+ 0,66 ++	+ 0,71 +++

Tab. 4.06

4.3.2. Kreatinausscheidung am Tag und in der Nacht

An 32 Urinsammlungen (bei 13 Männern und 19 Frauen) konnte die Kreatin- und Kreatininausscheidung am Tag (8⁰⁰ - 20⁰⁰ Uhr) und in der Nacht (20⁰⁰ - 8⁰⁰ Uhr) beobachtet werden. Die statistische Prüfung erfolgt mit dem Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben (Paardifferenztest, verteilungsunabhängig). Männer und Frauen scheiden am Tag mehr Kreatin aus als in der Nacht. Für die Gruppe der Frauen läßt sich dies auf dem 1%-Niveau sichern. Das durchschnittlich ausgeschiedene Harnvolumen ist bei Männern ($p < 0,05$) und Frauen ($p < 0,01$) am Tag wesentlich größer als in der Nacht.

Für die Kreatin- und Kreatininausscheidungen am Tag und in der Nacht ergeben sich hohe Korrelationen. Die Einzelergebnisse sind den Tabellen 4.07 und 4.08 zu entnehmen.

24-Stunden-Urine:

Männer: $n = 13$

	Kreatin (mg/12h)		Kreatinin (mg/12h)	
	Tag	Nacht	Tag	Nacht
$\bar{x}_A$	17,8	11,1	920	934
s	42,8	22,1	177	203
$\bar{x}_G$	5,5	5,4	904	915
Variationsbreite	1,6-157,2	2,01-83,9	633-1247	677-1293

Korrelationen:

<u>Variable</u>	<u>r</u>	<u>Signifikanz</u>
Kreatin Tag/Kreatin Nacht	+0,94	+++
Kreatin Tag/Kreatinin Tag	+0,70	++
Kreatin Nacht/Kreatinin Nacht	+0,87	+++
Kreatin Tag/ Harnvolumen Tag	+0,20	
Kreatin Nacht/Harnvolumen Nacht	-0,22	
Kreatinin Tag/Kreatinin Nacht	+0,79	++
Kreatinin Tag/Harnvolumen Tag	+0,06	
Kreatinin Nacht/Harnvolumen Nacht	-0,16	

Tab. 4.07

24-Stunden-Urine:Frauen: n = 19

	Kreatin (mg/12h)		Kreatinin (mg/12h)	
	<u>Tag</u>	<u>Nacht</u>	<u>Tag</u>	<u>Nacht</u>
$\bar{x}_A$	94,0	67,7	625	612
s	126,4	104,7	156	162
$\bar{x}_G$	30,5	20,7	607	593
Variationsbreite	2,8-409,7	2,2-408,9	401-880	403-953

Korrelationen:

<u>Variable</u>	<u>r</u>	<u>Signifikanz</u>
Kreatin Tag/Kreatin Nacht	+0,94	+++
Kreatin Tag/ Kreatinin Tag	+0,18	
Kreatin Nacht/Kreatinin Nacht	+0,42	
Kreatin Tag/Harnvolumen Tag	-0,10	
Kreatin Nacht/Harnvolumen Nacht	+0,22	
Kreatinin Tag/Kreatinin Nacht	+0,62	++
Kreatinin Tag/Harnvolumen Tag	+0,62	++
Kreatinin Nacht/Harnvolumen Nacht	+0,23	

Tab. 4.08

4.3.3. Fraktionierte Sammlung von 24-Stunden-Urinen zur Erkennung von Tagesschwankungen der Kreatinausscheidung

Noch schwieriger als die Sammlung von 24-Stunden-Urinen gestaltet sich die Gewinnung von fraktionierten Harnsammlungen, da sie hohe Anforderungen an die Probanden stellt und zudem recht belastend ist. Auf diese Versuche kann aber nicht verzichtet werden, da nur sie die Aufdeckung zirkadianer Rythmen der Kreatinausscheidung ermöglichen. Die freiwilligen Probanden wurden hierzu aufgefordert alle 2 Stunden die Blase gänzlich zu entleeren, das Harnvolumen zu messen und eine Harnprobe in einem fertig gekennzeichneten Eppendorf Reaktionsgefäß einzufrieren. Zusätzlich mußten Angaben über Zeitpunkt und Art der aufgenommenen Nahrung sowie über Ruhe- und Arbeitszeiten auf einem vorgefertigten Protokollbogen aufgezeichnet werden. Die Sammelperioden begannen zumeist um 8⁰⁰ Uhr früh und endeten um 8⁰⁰ Uhr des folgenden Tages. Gewertet wurden 12 2stündige Sammelintervalle, beginnend um 10⁰⁰ Uhr.

Die Probanden wurden zu Beginn der Untersuchung sorgfältig auf die Bedeutung der strikten Einhaltung der Versuchsbedingungen hingewiesen. Trotzdem konnten von ursprünglich 44 fraktionierten Harnsammlungen nur 11 Proben von Männern und 17 Proben von Frauen als zuverlässig gesammelt angesehen werden. Die laborchemische Aufarbeitung der tiefgefrorenen Proben erfolgte stets innerhalb der ersten 48 Stunden nach Beendigung der Sammelperiode.

Im einzelnen ergaben sich folgende Beobachtungen:

Für die meisten Männer und Frauen finden sich die höchsten Werte der Kreatinausscheidung zwischen 12⁰⁰ und 22⁰⁰ Uhr mit einem maximalen Mittelwert um 18⁰⁰ Uhr (Sammelperiode von 16⁰⁰ - 18⁰⁰ Uhr). In den Morgenstunden und am Vormittag werden ebenfalls für beide Geschlechter die niedrigsten Kreatinausscheidungen beobachtet. Die geringste Menge Harn-Kreatin wird von allen Männern (n = 11) zwischen 2⁰⁰ und 14⁰⁰ Uhr ausgeschieden, mit Minimalwerten um 8⁰⁰ und 14⁰⁰ Uhr. Innerhalb dieses Zeitraums zeigen sich jeweils nur gering-

füßige Änderungen der Kreatinausscheidung. Wie schon bei den gesamten 24-Stunden-Urien (4.3.1.) gezeigt wurde, streuen die Werte für das Harn-Kreatin bei Frauen in wesentlich größerem Maße. Ein Intervall niedrigster Werte läßt sich zwischen 6⁰⁰ Uhr und 12⁰⁰ Uhr finden, mit einem Minimalwert um 6⁰⁰ Uhr. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die renale Elimination von Kreatinin. Die niedrigsten Werte für das Harn-Kreatinin finden sich in den Morgenstunden, die höchsten Werte um 18⁰⁰ Uhr, wie dies auch für das Harn-Kreatin beobachtet wird. Die tageszeitlichen Schwankungen der Kreatininausscheidung sind aber nicht so deutlich wie die der Kreatinausscheidung. Da die Gipfel der Kreatinausscheidung etwa 4 Stunden nach dem Essen zu beobachten sind, ist insbesondere für Frauen ein Zusammenhang zwischen vermehrter Kreatinausscheidung und Fleischgenuß zu vermuten. An Hand von 4 ausgewählten Kurven sollen die geschilderten Verhältnisse graphisch veranschaulicht werden. Dargestellt sind die Kreatin- (ausgezogene Linie) und die Kreatininausscheidung (gestrichelte Linie) im Harn. Die gepunktete Linie stellt den Kreatin-Koeffizienten dar, der hier als das Massenverhältnis von Kreatin zu Kreatinin (in Prozent) berechnet wurde.

Die Abb 4.06 (T 35; Rohrer-Index 1,30) zeigt die typischen Verhältnisse bei männlichen Probanden. Die alle zwei Stunden ausgeschiedene Kreatinmenge übersteigt 1,0 mg nicht. Um 12³⁰ aß die Versuchsperson 100 g Rauchfleisch; um 16⁰⁰ Uhr wird ein Anstieg des Harn-Kreatins beobachtet. Gleichzeitig finden sich bei einem Anstieg der Konzentrationen und maximalem Harnvolumen höchste Werte für die renale Ausscheidung von Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure. Um 18⁰⁰ Uhr wird der höchste Wert für den Kreatin-Koeffizienten und der höchste Serum-Kreatinspiegel mit 0,48 mg/100ml (10⁰⁰ Uhr: 0,38 mg/100ml; 14⁰⁰ Uhr: 0,42 mg/100ml) beobachtet.

Abb. 4.07 (T 24; Rohrer-Index 1,49) zeigt den Extremfall aus der Gruppe der Männer. Gleichfalls werden hier um 18⁰⁰ Uhr Maximalwerte für Kreatin (91 mg!), Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure gefunden; das größte Harnvolumen wird

hingegen um 14⁰⁰ Uhr ausgeschieden. Es handelt sich hierbei aber um eine Einzelbeobachtung, für die keine Erklärung offensichtlich ist.

Bei den Frauen ergibt sich für die Tagesschwankungen ein wesentlich heterogeneres Bild als bei den Männern. Vorge stellt wird eine junge Frau (Abb 4.08; T 46; 21. Tag p.m.; keine Ovulationshemmer; Rohrer-Index 1,20) mit einer Kreatinausscheidung von 6,5 mg/24h. Der erste Morgen-Urin um 8⁰⁰ Uhr bleibt unberücksichtigt (Nacht-Urin). Nach dem Mittagessen um 13⁰⁰ Uhr mit etwa 100 g Rinderbraten kommt es zwar zu einem Anstieg der Kreatinkonzentration zwischen 16⁰⁰ und 18⁰⁰ Uhr; wegen der Abnahme des Harnvolumens ergeben sich jedoch kaum Änderungen. Ein solches Verhalten der Kreatinausscheidung konnte in 7 Fällen bei Frauen beobachtet werden. Gänzlich anders erscheint die Abb. 4.09. Hier handelt es sich um eine 20jährige Frau (T 45; Rohrer-Index 1,26) am 6. Tag des Zyklus, die zur hormonalen Kontrazeption orale Ovulationshemmer benutzt. Das Frühstück (6³⁰ Uhr) bestand u.a. aus einer Scheibe Toastbrot mit Corned-Beef; zum Mittagessen (gegen 15⁰⁰ Uhr) wurde Hähnchenfleisch gegessen. Das Auftreten von hohen Kreatinausscheidungen nach dem Verzehr kreatinhaltiger Nahrungsmittel bei Frauen während hormonaler Kontrazeption belegt auch Abb. 4.10 (T 12; Rohrer-Index 1,19). Nach dem Mittagessen um 13⁰⁰ Uhr (1 Schnitzel) steigt hier die Kreatinausscheidung/2 Stunden von 1,6 mg (12⁰⁰ Uhr) auf 121,1 mg (16⁰⁰ Uhr) an. Innerhalb eines Zeitraums von nur 6 Stunden (12⁰⁰ bis 18⁰⁰ Uhr) werden etwa 280 mg Kreatin ausgeschieden, dies könnte dem Kreatingehalt von 100 g Fleisch entsprechen. Bedauerlicherweise konnten bei diesen Probandinnen die Kreatinkonzentrationen im Serum nicht bestimmt werden.

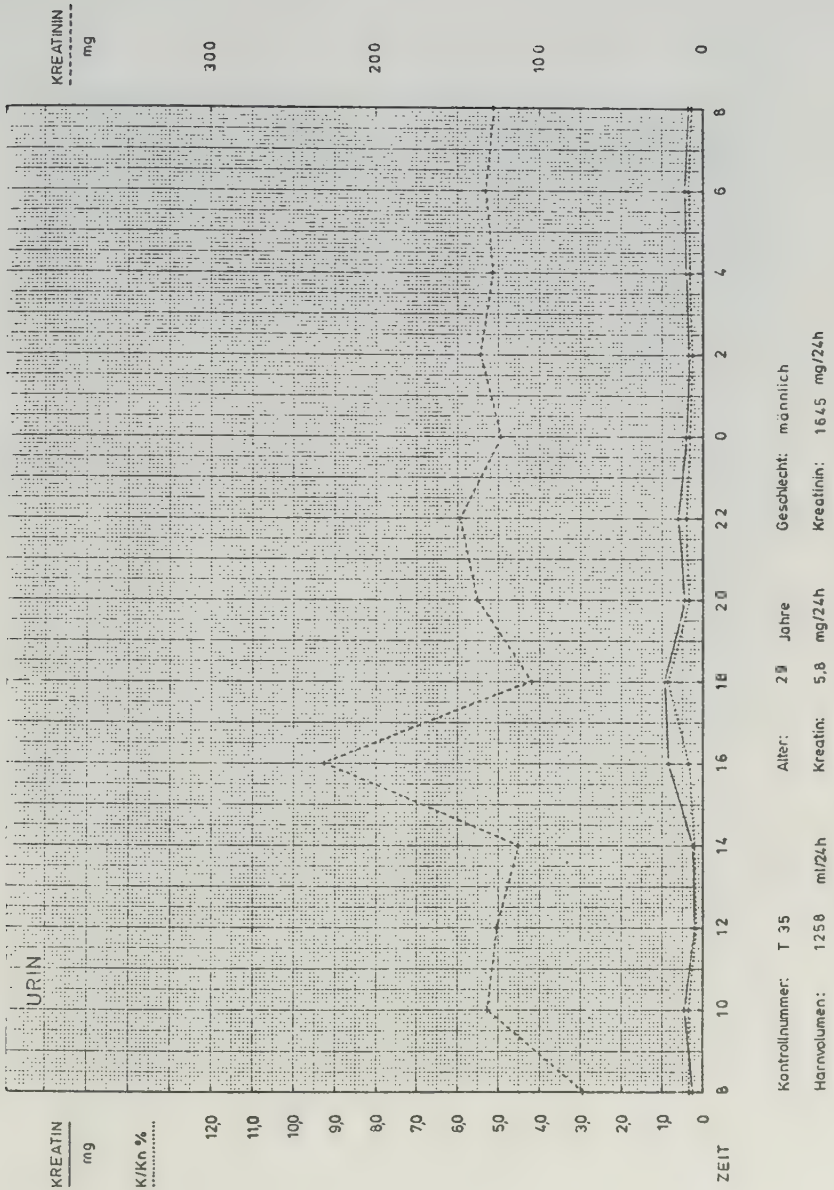


Abb. 4.06

Ausscheidungsdiagramm: Fraktionierte Harnsammlung

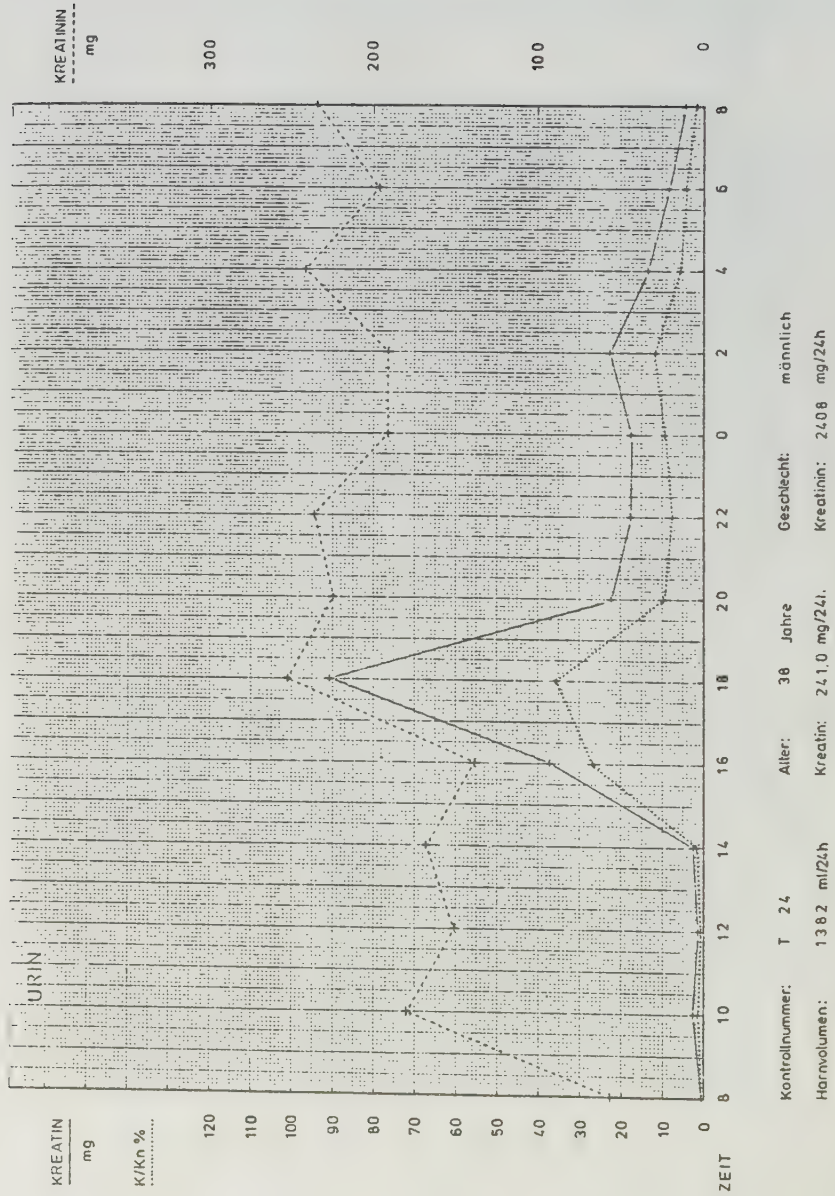


Abb. 4.07

Ausscheidungsdiagramm: Fraktionierte Harnsammlung

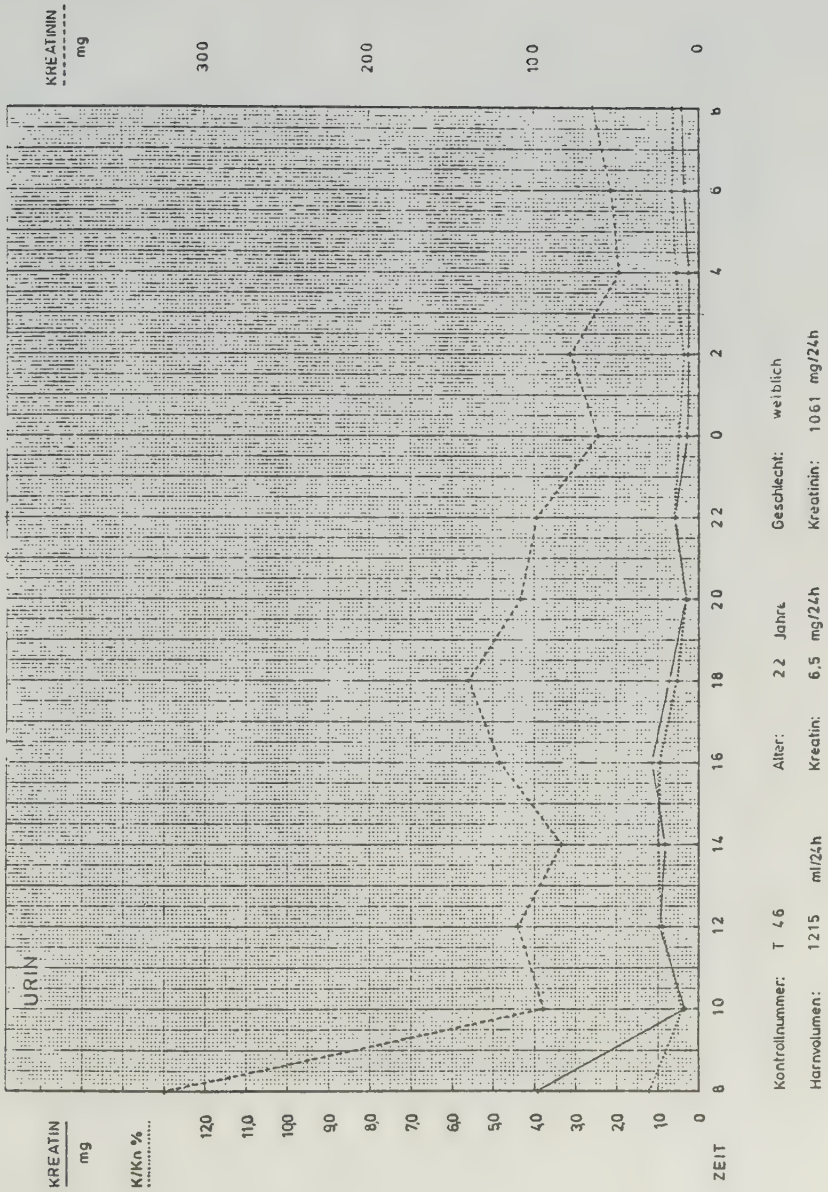


Abb. 4.08

Ausscheidungsdiagramm: Fraktionierte Harnsammlung

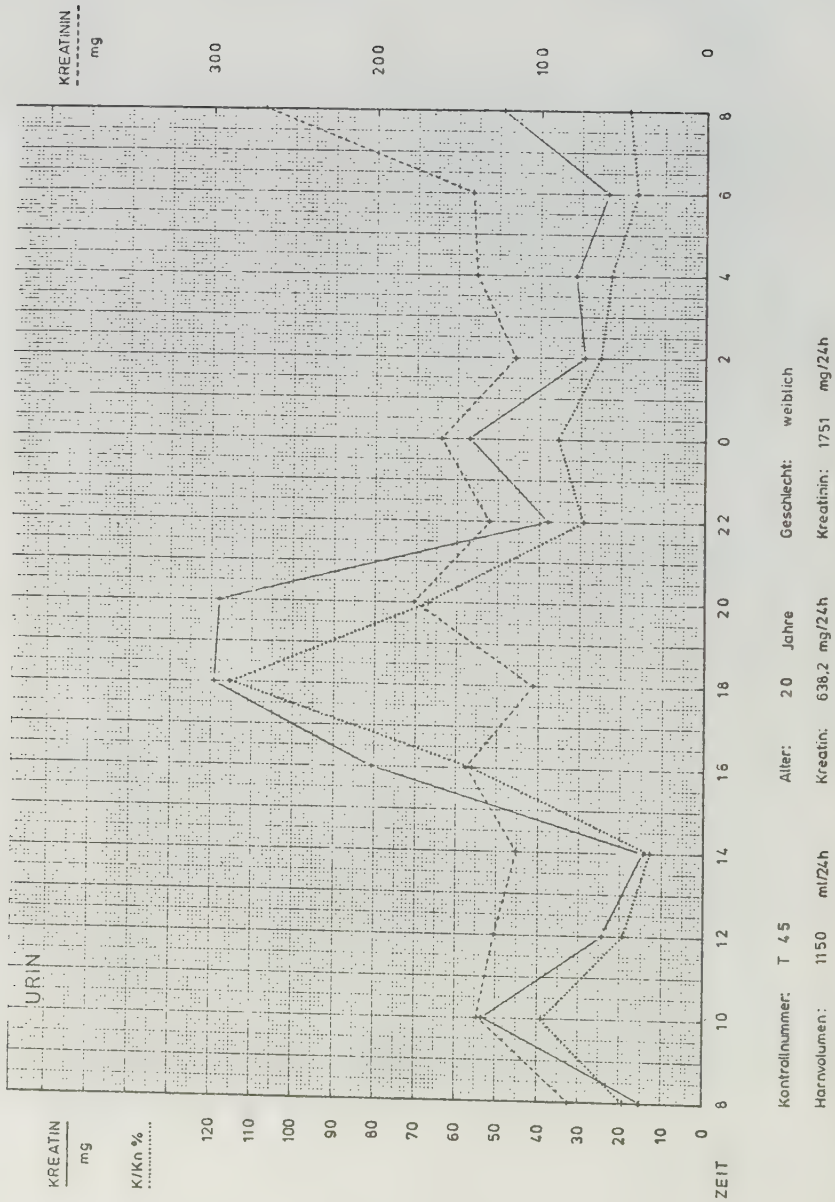


Abb. 4.09

Ausscheidungsdiagramm: Fraktionierte Harnsammlung

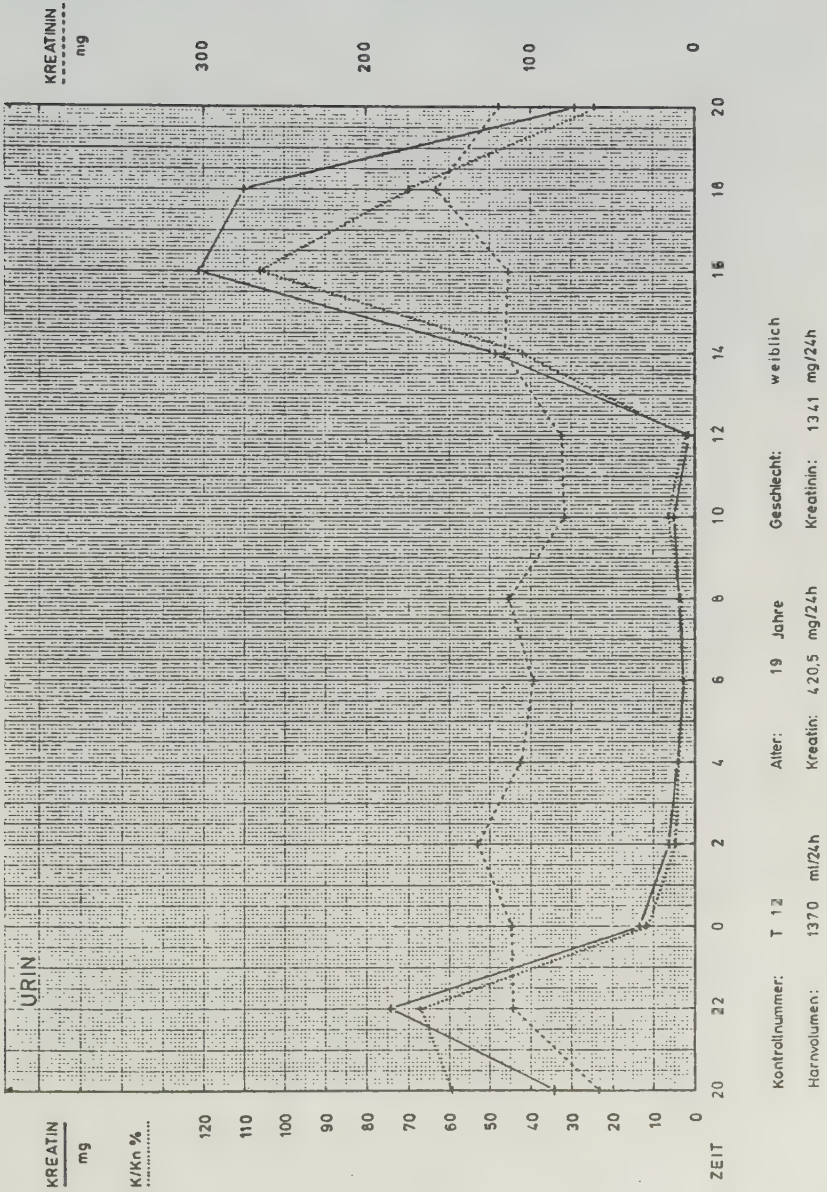


Abb. 4.10

Ausscheidungsdiagramm: Fraktionierte Harnsammlung

4.3.4. Kreatinausscheidung im morgendlichen Spontanurin an mehreren Tagen

Während einer Zeitspanne von 20 bis 40 Tagen konnte jeweils der zweite Morgen-Urin (Urin mit niedrigster Kreatinausscheidung) von 12 Männern und 16 Frauen täglich analysiert werden. Die Probanden wurden angehalten, die Zeit zwischen der ersten und zweiten Entleerung der Blase weitgehend konstant zu halten. Die Harnanalysen erfolgten zumeist am Tag der Probengewinnung, bzw. nach kurzzeitiger Lagerung der Proben im Gefrierschrank. Während der Langzeituntersuchungen ernährten sich 3 Männer und 4 Frauen streng vegetarisch. Errechnet wurden jeweils die durchschnittliche Kreatinkonzentration sowie ihre Variationsbreite. Der Mittelwertsvergleich erfolgte nichtparametrisch mit Hilfe des U-Tests. Auf Grund der geringen Stichprobenzahl konnte ein Vergleich der Kreatinkonzentrationen bei Vegetariern nicht erfolgen.

Kreatinkonzentration (mg/100 ml)			
<u>Männer</u>	n = 12	$\bar{x}$	R
vegetarische Kost	3	0,65	1,33
Normalkost	9	1,22	2,90
<u>Frauen</u>	n = 16	$\bar{x}$	R
vegetarische Kost	4	1,06	3,80
Normalkost	12	8,20	31,00

Tab. 4.09

Insgesamt fällt eine wesentlich größere Streuung der Kreatinkonzentration im morgendlichen Spontanurin bei den Frauen auf. Bei den Männern und Frauen haben jeweils die Probanden mit kreatinarmer Ernährung die geringeren Mittelwerte und Spannweiten für die Kreatinkonzentration. Auf dem 5%-Niveau signifikant unterscheiden sich die Mittelwerte für die Harn-Kreatinkonzentration bei männlichen Vegetariern und Nichtvegetariern sowie die Spannweiten der Harn-Kreatinkonzentration bei weiblichen Vegetariern und Nichtvegetariern.

Die Unterschiede in den Mittelwerten und Spannweiten der Harn-Kreatinkonzentration zwischen Männern und Frauen sowie die Mittelwertsdifferenzen zwischen Frauen mit vegetarischer und normaler Ernährung lassen sich sogar auf dem 1%-Niveau sichern.

Das gänzlich unterschiedliche Verhalten der Kreatinausscheidung im zweiten morgendlichen Spontanurin bei Männern und Frauen soll am Beispiel eines männlichen Probanden ($N\ 25 \pm T\ 35$; Rohrer-Index 1,30) und einer Probandin ($N\ 23 \pm T\ 12$; Rohrer-Index 1,12; orale Ovulationshemmer, Menses 20. - 23. Tag des Beobachtungszeitraums) während normaler Klinikskost gezeigt werden (Abb. 4.11 und 4.12; unterschiedliche Maßstäbe für Kreatin beachten).

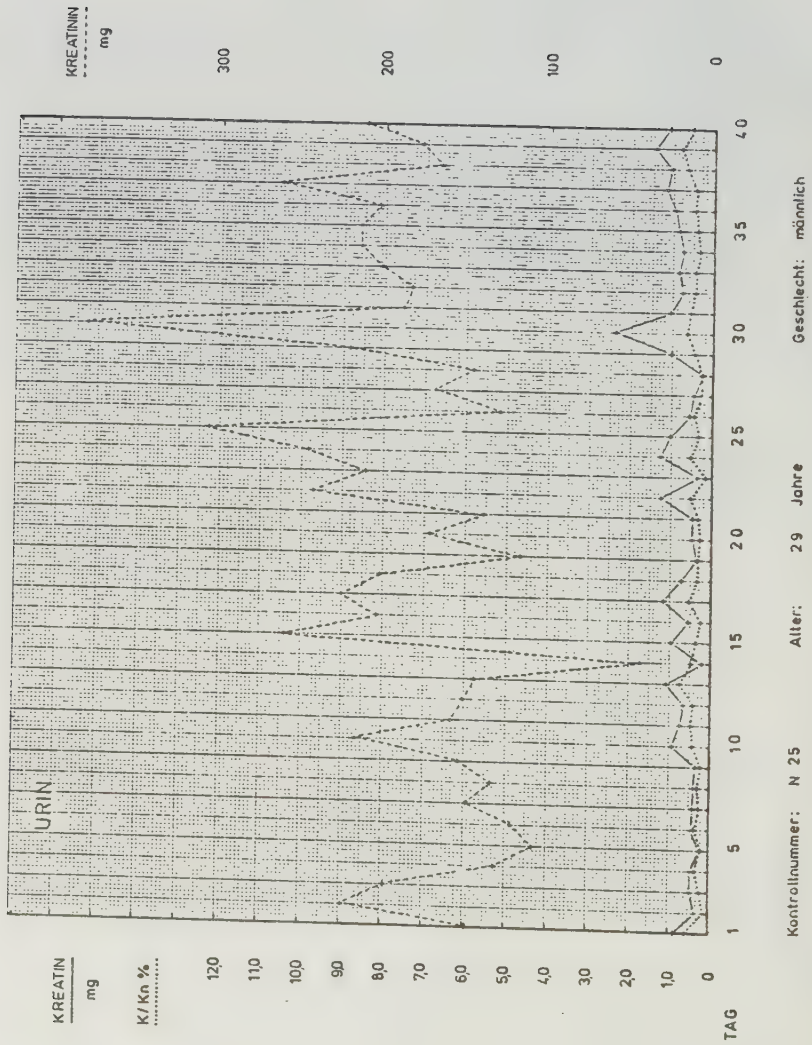


Abb. 4.11

Ausscheidungsdiagramm: Zweiter Morgenurin

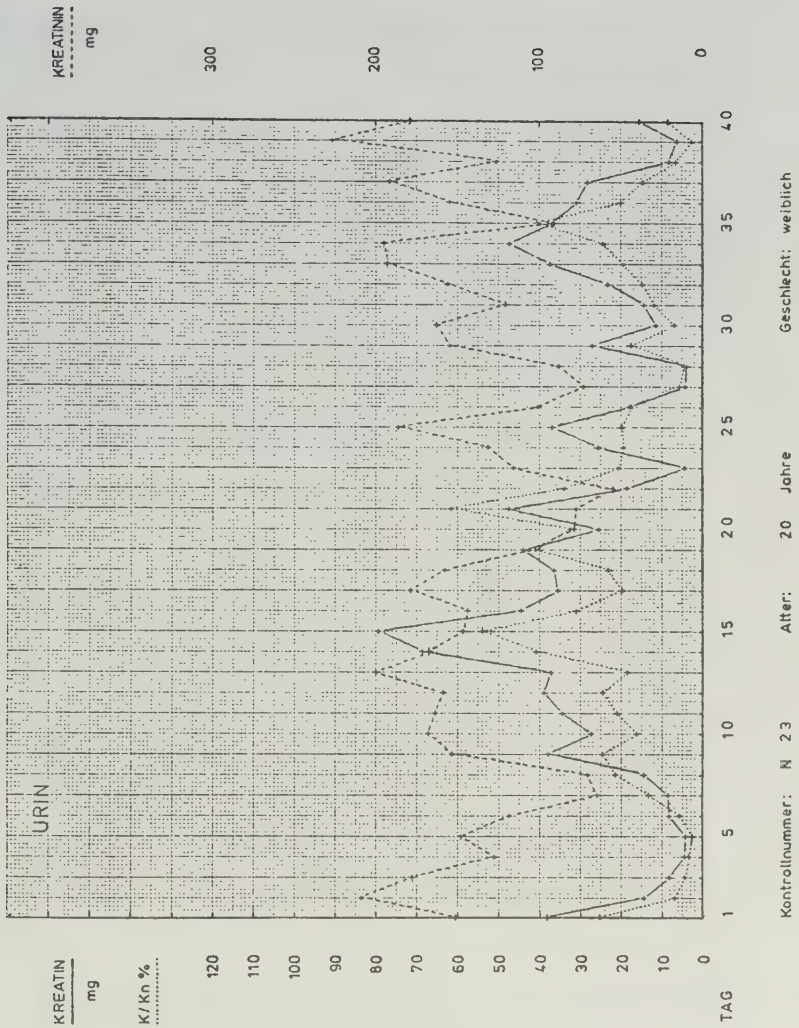


Abb. 4.12

Ausscheidungsdiagramm: Zweiter Morgenurin

4.3.5. Kreatinausscheidung im 24-Stunden-Urin an mehreren Tagen

Bei 6 Frauen und 6 Männern konnten an 6 Tagen innerhalb eines Zeitraums von 2 Wochen 24-Stunden-Urine untersucht werden *. Das Alter der männlichen Probanden betrug 28 - 36 Jahre (Rohrer-Index 1,12 - 1,39); die Frauen waren zwischen 25 und 59 Jahre alt (Rohrer-Index 1,08 - 1,45). Der Tabelle ist zu entnehmen, daß sich Männer und Frauen bezüglich der Variationsbreite der Kreatinausscheidung sehr stark unterscheiden ($p < 0,05$). Die Unterschiede der Mittelwerte für die Kreatinausscheidung lassen sich statistisch nicht sichern, hingegen finden sich signifikante Unterschiede für die Kreatinausscheidung im 24-Stunden-Urin ($p < 0,01$) (Tab. 4.10).

Kreatin- und Kreatininausscheidung an 6 Tagen							
		<u>Kreatin mg/24 h</u>			<u>Kreatinin mg/24 h</u>		
	n	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_G$	R	$\bar{x}_A$	$\bar{x}_G$	R
Männer	6	29,3	26,6	26,3	1845	1839	314
Frauen	6	126,1	74,2	150,0	1166	1143	270

Tab. 4.10

* Probanden zum Teil aus der Hochdruckambulanz

4.4. Normwerte für Kreatin in Serum und Urin

Auf Grund der Beobachtungen an 310 klinisch gesunden Probanden können Normalwerte für die Kreatinkonzentration im Serum angegeben werden (parameterfreie Berechnung, 95%). Da nur im Berufsleben stehende Personen berücksichtigt werden, ist die Altersverteilung etwas zugunsten der jüngeren Probanden verschoben.

Im Gegensatz hierzu haben andere Untersucher auch stationäre Patienten, die nicht an Erkrankungen der Muskulatur litten, als sogenannte Normalpersonen in ihre Statistiken aufgenommen (BERNHARDT 1977). Dieses Verfahren vereinfacht zwar die Datenerhebung, sollte aber für eine chemische Anthropometrie nicht benutzt werden.

Die Prüfung auf den Verteilungstyp ergibt bei Männern und Frauen für die Kreatinkonzentration im Serum und im Spontanurin sowie die Kreatinausscheidung im 24-Stunden-Urin eine logarithmische Normalverteilung. Die positiv schiefen, linkssteilen Verteilungen für die Serum-Kreatinkonzentrationen sind in Abb. 4.02 dargestellt. BERNHARDT hingegen berichtet von normalverteilten Werten (1977).

Für die Kreatinausscheidung im 24-Stunden-Urin lassen sich bei dem vorliegenden Material keine Normwertbereiche angeben; die Stichprobenumfänge erscheinen hierfür zu klein (20 Männer und 28 Frauen). Die aufgezeigten Variationsbreiten bei klinisch Gesunden sind aber wesentlich größer als dies von anderen Autoren angegeben wird.

Die Normwerte für Kreatin in Serum und Urin sind in den Tabellen 4.11 und 4.12 dargestellt.

Normbereiche für Kreatin im Serum

mg/100 ml	$\mu\text{mol/l}$	$\bar{x}$ (mg/100 ml)	n	Autor u. Methode
R 0,14 - 0,53	10,7 - 40,4	0,32	20 M	LAUBER 1966
R 0,11 - 0,94	8,4 - 71,7	0,44	23 F	Diacetyl-Reaktion
N bis 0,9	bis 68,6	0,50 $\pm$ 0,18	93 M	BERNHARDT 1977
N bis 1,05	bis 80,1	0,63 $\pm$ 0,19	38 F	Diacetyl-Reaktion
R 0,45 - 0,9	34,3 - 68,6	0,67 $\pm$ 0,12	6 M	KIBRICK/MILHORAT 1966
R 0,50 - 1,02	38,1 - 77,8	0,67 $\pm$ 0,12	13 F	enzymatisch I
R 0,14 - 0,39	10,7 - 29,7	0,25 $\pm$ 0,07	9 M	BERLET 1968
				enzymatisch II
N 0,3 - 0,7	22,9 - 53,4		? M+F	BERNT et al. 1974
				enzymatisch III
N 0,16 - 0,81	12,2 - 61,8	$\bar{x}_A$		
N 0,21 - 1,11	16,0 - 84,6	$\bar{x}_G$	158 M	vorliegende Arbeit
		0,36	152 F	enzymatisch IV
		0,55		

R = Variationsbreite
N = Normalbereich
M = Männer
F = Frauen

5. Diskussion

Die Ergebnisse der methodologischen Untersuchung zur enzymatischen Kreatininbestimmung wurden bereits in Kapitel 3.5. zusammengefaßt, in tabellarischer Form dargestellt und ausführlich diskutiert. An dieser Stelle soll deshalb nur noch auf die Anwendung des neuentwickelten eigenen Verfahrens bei einer Probandenuntersuchung eingegangen werden.

Mit Hilfe der enzymatischen Halbmikromethode ließ sich Kreatinin in sämtlichen Harnproben und zwar bei Männern und Frauen nachweisen. Die weitverbreitete Auffassung, daß Kreatinin im Urin bei Männern physiologischerweise nicht vorkommt (FRICK 1954), muß als überholt angesehen werden. Sie ist auf die mangelnde Spezifität und Empfindlichkeit der Farb-Reaktionen zurückzuführen, die eine Bestimmung von Kreatinin in geringen Konzentrationen nicht zuließen. Damit wäre die bei Muskelkranken vielfach beobachtete Kreatininurie nicht als ein klar abgesetztes qualitatives Ereignis aufzufassen, sondern nur ein quantitatives Abweichen vom "Normalen" (TANZER und GILVARG 1959). Hingegen wurde eine teils erhebliche Kreatininurie bei Kindern, Frauen und Schwangeren schon recht früh beobachtet (Literatur in KOUFEN und CONSRUCH 1972). Bei Kindern soll eine mäßige körperliche Belastung nicht zu einer signifikant vermehrten Kreatininausscheidung führen (SZCEPAŃSKI et al. 1971). Dagegen kommt es nach schwerer körperlicher Belastung in Form eines Fußmarsches von 100 km in 2 Tagen zu einer Zunahme der Kreatininausscheidung und einem Anstieg der Volumenaktivitäten der CK und SGOT (SHA-PIRO et al. 1973). Dies wird ebenso wie der erhöhte Serum-Kreatininspiegel nach exogenen Intoxikationen auf eine hypoxämische Schädigung der Skelettmuskulatur zurückgeführt (PRELLWITZ et al. 1970).

Bei Kindern wird entsprechend der Zunahme der Muskelmasse mit steigendem Alter immer mehr Kreatinin im 24-Stunden-Urin ausgeschieden. Ab dem 12. Lebensjahr übertrifft dabei die Kreatininausscheidung der Knaben diejenige der Mädchen. Bis zum 3. Lebensjahr ist die Kreatininausscheidung im Urin höher als die Kreatininausscheidung, um dann von Jahr zu

Jahr weiter abzunehmen. Dabei war die Kreatinausscheidung bei Kindern so unterschiedlich, daß im speziellen Fall eine Entscheidung zwischen "normal" und "pathologisch" fast unmöglich erschien (CLARK et al. 1951). Bei Erwachsenen läßt sich eine Verminderung des Muskelgewichts und der Muskelkraft nach dem 30. Lebensjahr beobachten. Diese Altersvorgänge sind nicht nur durch den morphologischen Abbau in den Muskeln bedingt, sondern auch durch Veränderungen in der Fähigkeit der Muskelzelle zur aeroben Energiegewinnung (WALTER 1978). Parallel mit der Rückbildung der Muskulatur verläuft die Kreatininausscheidung im Altersgang. Für Kreatin läßt sich wegen der hohen Variabilität eine zunehmende "Alterskreatinurie" nicht bestätigen (AHLERT et al. 1967). Die größte Komponente der fettfreien Körpermasse (lean body mass) ist die Muskulatur. Ähnlich wie beim Kreatinin ist für die Creatin-Kinase eine Abhängigkeit von der lean body mass nachzuweisen. Mit steigendem Alter nimmt daher die Enzymaktivität im Serum ab. Bei Sportlern mit höherem Anteil an lean body mass sind die CK-Aktivitäten über den Normalwertbereich hinaus erhöht (NOVAK und TILLERY 1977).

Versuche mit 3 immobilisierten Probanden ergaben eine deutlich vermehrte Ausscheidung von Harn-Kreatin nach 6 bis 8 Tagen mit Maximalwerten nach 11 bis 17 Tagen (HEILSKOV und SCHØNHEYDER 1955). Auch die Abnahme der Kreatinausscheidung bei freier Bewegung im Anschluß an eine Ruheperiode (Immobilisation) ließ sich an 5 männlichen Versuchspersonen zeigen. Für die während der Bettruheperioden gefundene höhere Kreatinausscheidung wurden Streßreaktionen verantwortlich gemacht (MACK und MONTGOMERY 1973). Bei total gelähmten Poliomyelitispatienten, die länger als 10 Jahre beatmet wurden, ergaben sich hohe Serum- und Urin-Kreatinkonzentrationen (2,0 mg/100 ml bzw. 487 mg/Tag) bei vergleichsweise extrem niedrigen Kreatinin-Werten. Endogen gebildetes Kreatin und Nahrungskreatin werden wegen der Inaktivität der Muskeln nicht von der Muskulatur aufgenommen, sondern direkt ausgeschieden (KUHLBÄCK und PASTERNAK 1971). Ähnliche Befunde gelten für Patienten mit progressiver Muskeldystrophie, die

eine erniedrigte Kreatinkonzentration in der Muskulatur aufweisen bei gleichzeitig erhöhtem Serum-Kreatinspiegel und vermehrter Kreatinausscheidung im Urin (HEYCK und LAUDAHN 1969).

Die Ausscheidung von Kreatin im Urin soll erfolgen, wenn der Serumspegel 0,5 mg/100 ml übersteigt. Während zugeführtes Kreatinin bei Gesunden mit intakter Nierenfunktion rasch ausgeschieden wird, kann Kreatin im Muskel weitgehend zurückgehalten werden. Bei Patienten mit Erkrankungen der Muskulatur führt die Zufuhr exogenen Kreatins zu Hyperkreatinämie und vermehrter Kreatinurie (HEYCK und LAUDAHN 1969). Beim Kreatintoleranztest läßt sich durch die orale Gabe von 10 - 30 mg Kreatin pro kg Körpergewicht bei diesen Patienten eine massive Kreatinurie erzeugen, während klinisch gesunde Probanden 70 - 100 % retinieren können. In der vorliegenden Untersuchung wird ebenfalls - aber nur bei Schwangeren und Frauen mit Anwendung oraler Ovulationshemmer - eine stark vermehrte Kreatinausscheidung nach Fleischgenuß beobachtet. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß die unterschiedlichen Serumkonzentrationen von Östrogenen und Gestagenen gewisse Auswirkungen auf die Kreatintoleranz haben. Viele bisher beobachtete Phänomene können hierin eine Erklärung finden. So ergibt sich erst nach dem 10. Lebensjahr eine deutlich höhere Östrogenausscheidung im Harn bei Mädchen als bei Jungen. Die im Urin ausgeschiedene Gesamtöstrogenmenge beträgt bei Männern (20 - 50 Jahre) durchschnittlich 10,3 µg/24 h, bei Frauen zwischen 18 und 41 Jahren dagegen 50 bis 60 µg/24 h (in der Zyklusmitte). Während der Schwangerschaft steigt der Östrogenspiegel gewaltig an, eine Woche nach der Geburt beträgt er immer noch ca. 31000 µg/24 h. Im Klimakterium sinkt er auf Werte um 5,5 µg/24 h ab (WALTER 1978). Auch die geschlechtsspezifischen Differenzierungsvorgänge während der Pubertät werden von Unterschieden in der Hormonproduktion hervorgerufen, wobei die Relation von Androgenen und Östrogenen möglicherweise eine Rolle spielt. So bilden sich die bei der anthropometrischen Probandenuntersuchung gefundenen geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Fettdicke und der Verteilung beim weiblichen Geschlecht

(Extremitäten, Hüften und Abdomen), sowie das unterschiedliche Verhältnis von Muskulatur und subcutanem Fettgewebe im wesentlichen erst in der Pubertät heraus (BERNHARD im Druck). Da gerade unter einer erhöhten Hormonsubstitution durch Ovulationshemmer bzw. in der Schwangerschaft eine vermehrte Kreatinausscheidung bei höchstwahrscheinlich verminderter Kreatintoleranz beobachtet wird, könnten viele geschlechtsspezifische Unterschiede im Körperbau sowie bei Kreatin in Serum und Urin ihre gemeinsame Ursache in einer unterschiedlichen Hormonproduktion bei Männern und Frauen haben.

Die aufgedeckten Tagesschwankungen der Kreatinausscheidung im Urin (Maximalwerte gegen 18⁰⁰ Uhr) ergeben sich wohl in erster Linie aus der zeitlichen Lage der Nahrungsaufnahme. Biologische Rhythmen, die sich im Serumspiegel verschiedener Stoffe bemerkbar machen, sind im Tierreich weit verbreitet. Sie finden aber erst in neuerer Zeit Beachtung bei Serum- und Urinuntersuchungen (SOLLBERGER 1972).

6. Zusammenfassung

Es wird eine neue Halbmikromethode zur enzymatischen Kreatininbestimmung in Serum und Urin vorgestellt. Die Durchführung des Testverfahrens wird - im Anschluß an die Diskussion der Testbedingungen - ausführlich beschrieben. Das Verfahren scheint für Untersuchungen in der klinisch-chemischen Diagnostik und für die humanbiologische Forschung gleichermaßen geeignet. Bei einem Methodenvergleich mit drei heute gebräuchlichen enzymatischen Analysenverfahren zeichnet sich der neue Test durch gute Praktikabilität bei hoher Präzision und Richtigkeit aus.

Die Erstellung von Normalbereichen für Kreatinin im Serum wird mit Hilfe einer Probandenuntersuchung an 310 im Berufsleben stehenden Individuen durchgeführt. Zusätzlich werden 52 Männer und 49 Frauen anthropometrisch untersucht. An dieser Teilstichprobe werden 59 Variablen erhoben. Weitere laborchemische Untersuchungen (Harnpflichtige Substanzen und Enzyme) sollen Aufschluß über Funktion von Leber, Niere und Muskulatur geben. Die statistische Berechnung erfolgt aber nur mit Daten von Individuen, für die sämtliche ermittelten Variablen innerhalb der vorgegebenen Normwertbereiche liegen.

Erwartungsgemäß korrelieren viele anthropometrische Maße - insbesondere die Stärke der Hautfalten - miteinander. Eine empirische Determiniertheit von anthropometrisch erfaßten Variablen und Laborwerten ist hingegen nicht gegeben.

Für die Kreatinkonzentrationen im Serum, Spontanurin und 24-Stunden-Urin ergeben sich geschlechtsspezifische Unterschiede. Die Mittelwertsdifferenzen sind statistisch gesichert ($p < 0,01$). Für die Kreatinkonzentration im Serum und Urin ist für beide Geschlechter eine log-normale Verteilung anzunehmen. Die parameterfreie Bestimmung der Normalwertbereiche für das Serum-Kreatinin (Transversal Betrachtung) ergibt bei 158 Männern $0,16 - 0,81 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x}_G = 0,34$) und bei 152 Frauen $0,21 - 1,11 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x}_G = 0,50$).

Im 24-Stunden-Urin scheiden Frauen ($n = 28$) signifikant mehr Kreatin aus als Männer ($n = 20$). Fraktionierte Harnsammlungen im Abstand von 2 Stunden ergeben für beide Geschlechter die niedrigsten Werte der Kreatinausscheidung in den frühen Morgenstunden und die höchste Ausscheidung zwischen 12⁰⁰ und 22⁰⁰ Uhr ($\bar{x}_{\max}$ gegen 18⁰⁰ Uhr). Ähnliche Beobachtungen gelten für die renale Elimination von Kreatinin. Die meisten Probanden scheiden tags (8⁰⁰ - 20⁰⁰ Uhr) mehr Kreatin aus als nachts. Die Ausscheidungswerte im Tag- und Nachturin ergeben hochsignifikante Korrelationen für Kreatin und Kreatinin. Interindividuelle Unterschiede in der Kreatinausscheidung in 24-Stunden-Urinen sind bei beiden Geschlechtern stark ausgeprägt. Die Variationsbreite bei klinisch gesunden Probanden beträgt für Männer 3,7 - 241,0 mg/24 h ($n = 20$; $\bar{x}_A = 39,1$ mg/24 h; $\bar{x}_G = 16,6$ mg/24 h), für Frauen 6,3 - 806,0 mg/24 h ($n = 28$; $\bar{x}_A = 158,1$ mg/24 h; $\bar{x}_G = 60,3$ mg/24 h). Die angegebenen Bereiche liegen damit wesentlich höher als dies von anderen Untersuchern beschrieben wird. Für Männer läßt sich eine positive Korrelation zwischen der Kreatinausscheidung und dem Index der Körperfülle statistisch sichern ($r = + 0,62$; $p < 0,01$); gleiches gilt für die Ausscheidung von Kreatinin ($r = + 0,60$; $p < 0,01$).

Longitudinaluntersuchungen an morgendlichen Spontanurinen (40 Tage) und 24-Stunden-Urinen (6 Tage) zeigen für Männer nur geringe intraindividuelle Änderungen der Kreatinkonzentration bzw. Kreatinausscheidung im Harn. Für Frauen ist diese relative Konstanz nicht gegeben. Die Aufnahme exogenen Kreatins mit der Nahrung scheint bei Frauen einen meßbaren Einfluß auf die Kreatinausscheidung im Harn zu haben. Die Beobachtung, daß höhere Kreatinkonzentrationen im morgendlichen Spontanurin mit höheren Serum-Kreatinwerten verknüpft sind, läßt sich ebenfalls nur für Frauen statistisch sichern ($r = + 0,72$; $p < 0,001$).

Beobachtungen an Frauen unter Anwendung von Ovulationshemmern und Schwangeren lassen die Vermutung zu, daß das verschiedenartige Verhalten von Serum- und Urin-Kreatin bei Männern und Frauen seine Ursache in der hormonellen Ausgangs-

lage der Geschlechter haben könnte (Östrogene und Androgene).

Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede, wie auch die verschiedene Ausprägung des Körperbaus (Muskel- und Fettverteilung), wären dann auf die Wirkung der Sexualhormone zurückzuführen.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

V	Testvolumen	ml
v	Probenvolumen im Testansatz	ml
t	Reaktionszeit	s
Δt	Meßzeitintervall	s
v	Reaktionsgeschwindigkeit	mol/s
v_i	Reaktionsgeschwindigkeit, initiale, bei $t = 0$ (praktisch)	mol/s
v_{eff}	Reaktionsgeschwindigkeit, effektive	mol/s
V	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	mol/s
k	Geschwindigkeits-Konstante	
K_m	Michaelis-Konstante	mol/l
[A]	Konzentration der Ausgangs- Substanz A bei t	mol/l
c	Substanzkonzentration	mol/l
x	Konzentration des Reaktions- produktes bei t	mol/l
b	katalytische Aktivitätskonzen- tration	kat/l
kat	Katal	mol/s
U	Internationale Enzymeinheit	$\mu\text{mol/min}$
$\%(v/v)$	Prozent, Volumen bezogen auf Volumen	
$\%(w/w)$	Prozent, Gewicht bezogen auf Gewicht	
d	Schichtdicke	mm
ϵ	Extinktionskoeffizient	$l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$
ΔE	Extinktionsänderung	

Signifikanz

+++/--	signifikant auf dem 0,1 %-Niveau ($p < 0,001$)
++/--	signifikant auf dem 1 %-Niveau ($p < 0,01$)
+/-	signifikant auf dem 5 %-Niveau ($p < 0,05$)

8. Literaturverzeichnis

- AHLERT, G.; BRÜSCHKE, G.; DIETZE, F.; FRANKE, H.; HAASE, J.:
 Altersabhängige Veränderungen und normale Schwankungen
 der Kreatinin- und Kreatinausscheidung.
 Zeitschrift für Alternsforschung 2 (1967) 113-118
- BERGMEYER, H.U. (Hrsg.):
 Methoden der enzymatischen Analyse Bd.I und II,
 Verlag Chemie, Weinheim; 3. Aufl. 1974
- BERGMEYER, H.U.; GAWEHN, K.:
 Grundlagen der enzymatischen Analyse
 Verlag Chemie, Weinheim-New York; 1977
- BERLET, H.H.:
 Enzymatic determination of creatine in serum and cerebro-
 spinal fluid.
 Clin. Chim. Acta 20 (1968) 149-154
- BERNHARD, W. (im Druck):
 Wachstum, Entwicklung, Konstitution.
 in Ziegelmeier (Hrsg.): Humanbiologie
 Fischer, Stuttgart
- BERNHARDT, W.:
 Der Kreatinhaushalt des Menschen. Früherkennung und
 Klinik der Dekompensation.
 Thieme, Stuttgart; 1977
- BERNHARDT, W.; EICKHOFF, W.:
 Prognostik neurogener und myogener Paresen mit Hilfe
 von Laboratoriumsbefunden.
 Fortsch. Neurol.-Psychiat. 42 (1974) 419-431
- BERNT, E.; BERGMEYER, H.U.; MÖLLERING, H.:
 Creatin. in: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.) Methoden der
 enzymatischen Analyse Bd. II,
 Verlag Chemie, Weinheim; 3. Aufl. 1974
- BOEHRINGER MANNHEIM:
 Biochemica Preisliste 1978/79 1978
- BONATZ, H.:
 Über die Entwicklung des subcutanen Fettgewebes und
 seine Bedeutung als gruppendifferenzierende Körperbau-
 variable bei männlichen Jugendlichen.
 Diss.Chr. Albr. Univ. Kiel 1970
- BORSOOK, H.; DUBNOFF, J.W.:
 The hydrolysis of phosphocreatine and the origin of
 urinary creatinine.
 J. Biol. Chem. 168 (1947) 483

BROŽEK, J.:

Human body composition: Approaches and applications.
Symposia of the Society for the Study of Human Biology
Vol. VII
Pergamon Press, Oxford·London·Edinburgh·New York·Paris·
Frankfurt; 1965

BUDDECKE, E.:

Grundriß der Biochemie
Walter De Gruyter, Berlin, New York; 4. neubearb. Aufl.
1974

BUDDECKE, E.:

Pathobiochemie
Walter De Gruyter, Berlin, New York; 1978

CANTAROW and TRUMPER

Clinical Biochemistry
Hrsg. A.L. Latner; W.B. Saunders Company, Philadelphia,
London, Toronto; 7. Aufl. 1975

CHEMNITZ, G.; SCHMIDT, E.; KOLLER, P.U.; BUSCH, E.W.:

Kreatinkinase. Überarbeitete Standardmethode: Referenz-
werte und Klinik.
Dtsch. med. Wschr. 104 (1979) 257-260

CLARK, L.C.; THOMPSON, H.L.; BECK, E.I.; JACOBSON, B.S.:

Excretion of creatine and creatinine by children.
Amer. J. Dis. Child. 81 (1951) 774

COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O.:

Methods in Enzymology Vol. XXIV Part B
Academic Press, New York, London; 1972

COMI, L.I.; GIUGLIANO, M.A.; LIMONGELLI, F.M.; PUNZO, R.:

L'indice creatinico nella diagnostica delle miopatie.
Un nuovo metodo di determinazione.
Minerva Medica 69 (1978) 229-235

CREMER, H.-D.; HÖTZEL, D.:

Ernährungslehre und Diätetik. Ein Handbuch in 4 Bänden
Angewandte Ernährungslehre Bd. III
Thieme, Stuttgart 1974

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE

Standard-Methode zur Bestimmung der Aktivität der
Creatin-Kinase.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15 (1977)

DIEM, K.; LENTNER, C.:

Documenta Geigy. Wissenschaftliche Tabellen.
Geigy Pharmazeutika, Wehr(Baden); 7. Aufl. 1977

DUNICZ, B.L.:

Simple and accurate method for the determination of creatine and creatinine.
Clin. Chim. Acta 9 (1964) 203-209

EGGLETON, P.; ELSDEN, S.R.; GOUGH, N.:

The estimation of creatine and of diacetyl.
Bioch. J. 37 (1943) 526-529

EICKSTEDT, E. v.:

Die Forschung am Menschen. Geschichte und Methoden der Anthropologie.
Enke, Stuttgart; 1940

FEHR, J.; KNOB, M.:

Das Erythrozytenkreatin: ein wertvoller Indikator des Zellalters und den Retikulozyten überlegenes indirektes Hämolysekriterium.
Schweiz. med. Wschr. 107 (1977) 1470-1471

FOLIN, O.:

Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harn
Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 41 (1904) 223

FRICK, E.:

Zur zentralen Genese der Kreatinurie.
Dtsch. Zschr. Verdauungskrrh. 14 (1954) 159-166

FROMAGEOT, C.; WATREMEZ, M.:

Comparaison entre les pouvoirs tampon du glycocole et de la glycylglycine.
Compt. rend. 190 (1930) 1459-1462

FÜNFELD, E.W.:

Zur Kraftmessung der Hand und zur Simulationsprüfung.
Dtsch. med. Wschr. 91 (1966) 2214-2216

GOOD, N.E.; WINGET, G.D.; WINTER, W.; CONNELLY, T.N.; IZAWA, S.; SINGH, R.M.M.:

Hydrogen ion buffers for biological research.
Biochemistry 5 (1966) 467-477

GREENSTEIN, J.P.:

Studies of the peptides of trivalent amino acids.
J. Biol. Chem. 101 (1933) 603

GRIFFITHS, W.J.:

The determination of creatine in body fluids and muscle, and of phosphocreatine in muscle, using the AutoAnalyzer.
Clin. Chim. Acta. 9 (1964) 210-213

GUGGENHEIM, M.:

Die Biogenen Amine und ihre Bedeutung für die Physiologie und Pathologie des pflanzlichen und tierischen Stoffwechsels.

Karger, Basel; 4. Auflage 1951

GUNDLACH, G.; HOPPE-SEYLER, G.F.; JOHANN, H.:

Die automatische Kreatinbestimmung mit Hilfe der Diacetyl-Reaktion.

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6 (1968) 415-418

HALLMANN, L.:

Klinische Chemie und Mikroskopie.

Thieme, Stuttgart; 10. Neubearb. Aufl. 1966

HEILSKOV, N.C.S.; SCHØNHEYDER, F.:

Creatinuria due to immobilization in bed.

Acta Medica Scandinavica. Vol. CLI, fasc. I (1955)
51-56

HEYCK, H.; LAUDAHN, G.:

Die progressiv-dystrophischen Myopathien.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 1969

HEYCK, H.; LAUDAHN, G.:

Fermentaktivitätsbestimmungen in der gesunden menschlichen Muskulatur und bei Myopathien.

Klin. Wschr. 41 (1963) 905

KANIG, K.:

Zur photometrischen Bestimmung von Kreatin mit der Diacetyl-Methode.

Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 306 (1957) 247

KARLSON, P.:

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.

Thieme, Stuttgart; 9. Neubearb. Aufl. 1974

KIBRICK, A.C.:

Creatine in urine: its determination by means of creatine phosphokinase. Observations in normal men and women.

Clin. Chim. Acta 11 (1965) 408-413

KIBRICK, A.C.; MILHORAT, A.T.:

A method for the determination of creatine in blood serum with creatine phosphokinase.

Clin. Chim. Acta 14 (1966) 201-206

KLIMT, F.:

Die Handkraft im Kindesalter.

Archiv für Kinderheilkunde 179; Enke, Stuttgart; 1969

KOUFEN, H.; CONSRUCH, U.:

Kreatinurie als Kriterium in der neurologischen Diagnostik.
Fortschr. Neurol. Psychiat. 40 (1972) 370-387

KREISBERG, R.A.:

Measurement of muscle mass in humans by isotopic dilution of creatine- 14 C.
J. Appl. Physiol. 28 (1970) 264-267

KUHLBÄCK, B.; PASTERNAK, A.:

Serum and urinary creatine and creatinine in paralytic poliomyelitis.
Acta med. scand. 189 (1971) 143-144

LAU, H.K.Y.; GUILBAULT, G.G.:

A fluorometric kinetic method for creatine in urine.
Clin. Chim. Acta 53 (1974) 209-216

LAUBER, K.:

Bestimmung von Kreatin in Serum und Urin.
Zschr. klin. Chem. 4 (1966) 119-122

LAUDAHN, G.; HARTMANN, E.; ROSENFELD, E.M.; WEYER, H.; MUTH, H.W.:

Normalwerte der Serum-Transaminasen bei Verwendung substrat-optimierter Testansätze zur Aktivitätsmessung.
Klin. Wschr. 48 (1970) 838

LEHNINGER, A.L.:

Biochemistry.
Worth Publishers, New York; Sec. Ed. 1975

LINDEGÅRD, B.:

Variations in human body-build.
Acta Psych. Neurol. Supp. 86 (1953)

LOEFFLER, G.:

Zur Frage des genetischen Einflusses auf die Ausscheidung von Kreatin und Kreatinin im Urin.
Dissertation Heidelberg 1964 a

LOEFFLER, G.:

Zur Frage des genetischen Einflusses auf die Ausscheidung von Kreatin und Kreatinin im Urin.
Humangen. 1 (1964 b) 170-193

MACK, P.B.; MONTGOMERY, K.B.:

Study of nitrogen balance and creatine and creatinine excretion during recumbency and ambulation of five young adult human males.
Aerospace Med. 1973

MARTIN, R.; SALLER, K.:

Lehrbuch der Anthropologie. Bd. I, II, III
Fischer, Stuttgart; 3. Aufl. 1959

MERCK

Präparate für die Biochemie
Merck, Darmstadt 1978

MERCK

Reagenzien - Diagnostika - Chemikalien
Merck, Darmstadt 1978

MILHORAT, A.T.:

Creatine and creatinine metabolism and disease of the
neuro-muscular system.
in: Metabolic and toxic diseases of the nervous system
Hrsg. Merrit, H.H.; Hare, C.C.
Williams & Wilkins Comp. Baltimore; 1953

NETTER, H.:

Theoretische Biochemie.
Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1959

NEUMEIER, D.; PRELLWITZ, W.; LANG, H.; KNEDEL, M.:

Die Bestimmung des Isoenzym CK-MB im Serum mit der
immunologischen Inhibitionsmethode.
Der Internist 19 (1978) 603-606

NOVAK, L.P.; TILLERY, G.W.:

Relationship of serum creatine phosphokinase to body
composition.
Human biology 49 Nr. 3 (1977)

NYMAN, G.E.:

Variations in personality. A multidimensional study on
a series of 300 healthy, 20-year-old Swedish army men.
Lund 1956

PETZOLD, D.;, WENDELIN, T.:

Enzymatische Mikroanalysenmethoden von energiereichen
Phosphaten, Glukose und Glukosemetaboliten in biotisch
gewonnenem Material aus der Muskulatur des Menschen.
1. Mitteilung: Enzymatische Bestimmung von ATP, ADP, AMP,
KP und Kr.
Z. med. Labortechn. 17 (1976) 291-299

PRELLWITZ, W.:

Klinisch-chemische Diagnostik.
Thieme, Stuttgart; 2. Aufl. 1976

PRELLWITZ, W.; SCHUSTER, H.-P.; SCHYLLA, G.; BAUM, P.;
SCHÖNBORN, H.; V. UNGERN-STERNBERG, A.; BRODERSEN, H.C.;
POEPLAU, W.:

Zur Differentialdiagnose von Organbeteiligungen bei exo-
genen Intoxikationen mit Hilfe klinischer und klinisch-
chemischer Untersuchungen.

Klin. Wschr. 48 (1970) 51-53

RAAFLAUB, J.; ABELIN, I.:

Über eine Methode der direkten Bestimmung des Kreatin-
gehalts des Harnes.

Biochem. Z. 321 (1950) 158-165

RAPOPORT, S.M.:

Medizinische Biochemie.

VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin; 7. Aufl. 1977

RICHTERICH, R.; COLOMBO, J.P.:

Klinische Chemie. Theorie, Praxis, Interpretation.

Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney;
4. Aufl. 1978

SACHS, L.:

Angewandte Statistik. Planung und Auswertung, Methoden
und Modelle

Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 4. Aufl. 1974

SALLER, K.:

Lehrbuch der Anthropologie Bd. I

Fischer, Stuttgart; 3. völlig umgearb. und erw. Aufl. 1957

SHAPIRO, Y.; MAGAZANIK, A.; SOHAR, E.; REICH, C.B.:

Serum enzyme changes in untrained subjects following
a prolonged march.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 51 (1973)

SITZMANN, F.C.:

Normalwerte.

H. Marseille, München 1976

SMITH, E.R.B.; SMITH, P.K.:

Thermodynamic properties of solutions of amino acids
and related substances.

J. Biol. Chem. 146 (1942) 193-194

SOLLBERGER, A.:

Biologische Rhythmusforschung.

in: Gadamer, H.G. und Vogler, P. (Hrsg.) Neue Anthropologie
Bd 1; Biologische Anthropologie Erster Teil
dtv Wissenschaftliche Reihe, München 1972

SRIVASTAVA, K.K.; RAO, Y.B.M.; BHARDWAJ, S.K.; CHANDER, A.
MALHOTRA, M.S.:

Serum creatine phosphokinase activity and urinary excretion
of creatine and creatinine in man during acclimatization
to high altitude and in high altitude natives.
Aerospace Med. 44 (1973) 272-275

STAMM, D.:

Tagesschwankungen der Normalbereiche diagnostisch wichtiger
Blutbestandteile.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 73 (1967) 982

SYLLM-RAPOPORT, I.; DUMDEY, E.; RAPOPORT, S.:

Creatine transport into human red blood cells.
Acta biol. med. germ. 36 (1977) 415-416

SZASZ, G.; BÖRNER, U.; STÄHLER, F.; BABLOK, W.G.:

Reference values for creatinine in serum established
by a highly specific enzymatic method.
Clin. Chem. 23 (1977)

SZCZEPAŃSKI, Z.; MUSIALOWICZ, J.; NOWOTNY, J.:

Współczynnik kreatyniowo-kreatynowy jako wskaźnik
kreatynurii u dzieci w wieku szkolnym.
Polski Tygodnik Lekarski 26 (1971) 1234-1236

TANNER, J. H.:

Current advance in the study of physique.
Lancet 1 (1951) 475-478

TANNER, J.M.; WHITEHOUSE, R.H.:

The Harpenden Skinfold Caliper.
Am. J. Phys. Anthr. 13 (1955) 743-746

TANZER, M.L.; GILVARG, C.:

Creatine and creatine kinase measurement.
J. Biol. Chem. 234 (1959) 12

TAUSSKY, H.H.:

A procedure increasing the specificity of the Jaffé
reaction for the determination of creatine and creatinine
in urine and plasma.
Clin. Chim. Acta 1 (1956) 210

THOMAS, L.:

Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von
Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.
Med. Verlagsges. Marburg; 1978

VASILIADES, J.:

Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine:
I. Kinetics and mechanism of formation of the mono-
creatinine picric acid complex.
Clin. Chem. 22 (1976)

VOGEL, H.U.V.; SYNOWIETZ, C.:

Chemiker-Kalender.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 2. Aufl. 1974

WALKER, J. B.:

Repression of arginine-glycine transamidinase activity
by dietary creatine.
Biochim. Biophys. Acta. 36 (1959) 574-575

WALKER, J. B.:

Metabolic control of creatine biosynthesis. I. Effect of
dietary creatine.
J. Biol. Chem. 235 (1960) 2357-2361

WALTER, H.:

Sexual- und Entwicklungsbiologie des Menschen.
dtv, Thieme, Stuttgart; 1978

WEISS, G.:

Diagnostische Bewertung von Laborbefunden.
Lehmanns, München; 4. Aufl. 1976

WILCOX, H.G.; FRIED, M.:

Studies on rat-liver glycylglycine dipeptidase.
Biochem. J. 87 (1963) 192

WIRTHS, W.:

Ermittlung des Ernährungszustandes.
in: Ernährungslehre und Diätetik Bd. III; Cremer H.D. und
Hötzel, D. (Hrsg.)
Thieme, Stuttgart; 1974

ZERSSEN, D. v.:

Dimensionen der morphologischen Habitusvariationen
und ihre biometrische Erfassung.
Z. menschl. Vererb.- u. Konstit.-Lehre 37 (1964) 611-625

ZIEGENHORN, J.; SENN, M.; BÜCHER, T.:

Molar absorptivities of β -NADH and β -NADPH.
Clin. Chem. 22 (1976) 151-160

Lebenslauf

Wulf Quester

Am 20.4.1949 wurde ich als erster Sohn des damaligen Bühnenbildners und späteren Hochschullehrers Ernst Quester und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Horn, in Flensburg geboren. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

Ausbildung

1955 - 1960	Volksschule, Meisenheim am Glan und Mainz
1960 - 1968	Gymnasium, Mainz
1968 - 1976	Studium der Fächer Biologie und Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Seit 1974	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Prüfungen

1968	Abitur
1975	Diplom-Biologen-Hauptprüfung
1975	Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien Fächer: Biologie und Chemie
1978	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1976 - 1977	16 Monate Zivildienst am Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
1977 - 1980	Experimentelle Arbeiten an den Laboratorien der Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätskliniken in Mainz (Leitung: Prof. Dr. W. Prellwitz)

